

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

**ASPECTOS REPRODUTIVOS DE RATOS OBESOS E
DIABÉTICOS**

MARCOS GOMIDES CARVALHO

Botucatu - SP

Abril/2019

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

**ASPECTOS REPRODUTIVOS DE RATOS OBESOS E
DIABÉTICOS**

MARCOS GOMIDES CARVALHO

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

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Botucatu – SP
Abril/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Carvalho, Marcos Gomides.

Aspectos reprodutivos de ratos obesos e diabéticos /
Marcos Gomides Carvalho. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Capes: 50504002

1. Diabetes mellitus. 2. Obesidade. 3. Proteômica. 4.
Reprodução animal.

Palavras-chave: Diabetes; Fisiologia espermática ;
Obesidade; Proteômica; Reprodução .

Nome do autor (a): Marcos Gomides Carvalho

Título: ASPECTOS REPRODUTIVOS DE RATOS OBESOS E DIABÉTICOS

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

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

Profa. Dra. Alessandra Melchert

Membro

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ - UNESP, Botucatu/SP.

Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Membro

Departamento de Doenças Tropicais – CEVAP - UNESP, Botucatu/SP.

Data da defesa:

25 de abril 2019

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza, pela paciência e competência na minha orientação, por quem tenho grande admiração por ser um exemplo profissional, pessoal, tendo papel fundamental em meu amadurecimento durante esse percurso. Obrigado por ter acreditado na minha capacidade, pelo carinho e amizade. Obrigado por muitas vezes ter soltado minha mão, para poder aprender a solucionar problemas, mesmo falhando algumas vezes, quando na verdade você estava só esperando para entrar em ação.

A Profa. Dra. Cláudia Valéria Seullner Brandão, por ceder o Biotério local da FMVZ UNESP onde foi realizado todo o experimento. Obrigado pela paciência e compreensão por longos 10 meses. A Profa. Dra. Alessandra Melchert por ter contribuído com o delineamento experimental, ajudando a estender o estudo até outros profissionais possibilitando análise de mais materiais melhorando a qualidade do estudo. Também quero agradecer por ter disponibilizado todo o material para adaptação correta dos animais ao biotério. Muito obrigado pelo bom humor, pela amizade e pelo crédito atribuído a pesquisa, e por estar presente no momento da coleta ajudando e auxiliando a todos que estavam presentes, graças ao seu incentivo acadêmico, montamos uma bela equipe, onde todos nós aprendemos muito.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves Departamento de Clínica Veterinária- Setor de Patologia Clínica-FMVZ- UNESP, por toda prontidão em escutar e esclarecer minhas dúvidas sempre com muita preocupação, ajudando a melhorar o processamento e análise do material de histologia.

Ao Prof. Dr. João Luiz Amaro e Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano do Departamento de Urologia da FMB UNESP por estarem presentes no momento da coleta do material, somando aprendizado e por terem possibilitado os imunoenaios realizados pela Maria Regina Moretto Assistente de Suporte Acadêmico FMB-Unesp/Unipex, a todos o meu muito obrigado.

Aos servidores do Biotério Central da Unesp, os quais sempre me atenderam com muito carinho fornecendo os animais dentro dos princípios éticos experimentais. Em especial a Sislaine Aparecida Balestrim Alquati, também bióloga, pelo carinho e amizade, que sempre esteve disposta a ajudar, a quem muitas vezes em momento de sufoco recorri, creio que foi a época que mais tocou seu telefone, muito obrigado por tudo.

A Profa. Dra. Wilma de Grava Kempinas do Departamento de Morfologia, IBB-UNESP por ceder gentilmente os laboratórios para a realização da pesquisa. Em especial sua orientadora de doutorado Josiane de Lima Rosa, pelos momentos de desespero e correria juntos terminando em alegria e amizade, obrigado por ter feito do meu experimento o seu, admiro todo seu comprometimento e profissionalismo.

A todos os profissionais e alunos que compõem o Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ- UNESP, Botucatu/SP. Em especial A Profa. Dra. Fernanda Landim, Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa e a Profa. Dra. Eunice Oba por ceder gentilmente os laboratórios para a realização do projeto e estar sempre dispostos a contribuir. A Dra. Camila Paula Freitas-Dell'Aqua pelo bom humor e entusiasmo com a pesquisa, durante meses de piloto em busca de aprimorar os resultados do experimento, obrigado pela paciência, carinho e pela dedicação. Gostaria de agradecer ao Felipe, Dona

Raquel, Dona Lurdes e Evandro, pelos momentos de descontração, por tornarem os momentos de descansos em total alegria, obrigado por toda o exemplo de humildade e simplicidade, são pessoas indispensáveis e que cuidam e auxiliam para o bom funcionamento do departamento, também sempre dispostos a ajudar.

A todos os colegas do laboratório REPAS e Eletroforese, Otávio, Michele, Laura, por todos os momentos compartilhados de desespero ou alegria, por todas as horas de conversas, pois também é necessário. Obrigado por tornarem a convivência tranquila e harmoniosa fazendo com que me sentisse em “casa”, por contribuírem de forma única e de acordo com suas áreas de apresetizado específicas engrandecendo muito o projeto de pesquisa. E queria desculpar por minha alegria demasiada e euforia, risos.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, por tornar possível a realização do curso de mestrado, e a cada um dos professores que me permitiram participar das aulas e pelos ensinamentos acadêmicos em diferentes institutos.

Ao programa da CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Esse parágrafo gostaria de agradecer em especial a equipe que esteve comigo do início ao fim garantindo que tudo fosse possível, com muitas horas de estudo individual posteriormente sendo somado em um objetivo só. Por abraçarem esse projeto com tanta dedicação e profissionalismo, sinceramente tudo que foi realizado só aconteceu porque tinham vocês, pois sozinho ninguém consegue chegar a lugar nenhum. Em momentos de desespero vocês tornavam tudo mais simples. Esse trabalho é tanto meu quanto de vocês, e não tenho palavras suficientes ou mesmo vocabulário para agradecer o quanto gostaria. Essa parceria foi formada por: Kelly, Cristiane, Viviana, Pablo.

Aos meus amigos Carol Scott, Kelynya meu amor, Kite, Rubia, Laiza princesa, Vivi fartura, Vivi mama, Pablo papa, Lauuuu, Lu, Jaque, Gaibe,IVALDO, Lais xerox, Alice, Dona Cleusa. Também as pessoas que me acompanharam desde a graduação Lais e Suzane. As amizades internacionais temporárias e duradoras, Cristian, Javier, John, Andrés, Santi, Alejo, Diego, Tiago portuga. Amo vocês obrigado por todo apoio emocional e profissional, por toda alegria e lembranças que carrego em meu coração, momentos inesquecíveis que levo para onde for, contem comigo sempre. Nossa vivemos muitas coisas, e cada um sabe a importância que tem. Agradeço e me desculpa todas as pessoas que possa ter esquecido, mas que passaram pela minha vida acrescentando e me tornando uma pessoa melhor. Obrigado por todos os momentos bons e ruins compartilhados. Vocês são minha mais “nova” família. E ao mais recente chegado Juan Pablo, por ter trazido paz e tranquilidade em momentos difíceis.

Aos meus amigos de longe e de infância, pois, “melhor que fazer novas amizades é manter as velhas”, também sempre apoiando e torcendo, Luiza, Soraya, Aline, Jema, Paula, Vanila, Betânia, Gruppi, Tarley, Carol, Joãozinho. Me desculpa se mais uma vez esqueço pessoas importantes. Obrigado por todos os momentos bons e ruins compartilhados, mesmo distantes estiveram sempre presentes. Amo vocês velha família.

A minha família, pais: Ginaldo Inácio e Maria Terezinha, aos meus irmãos: Ricardina, Mariana e Ginaldo Jr. e avó Candida, por sempre acreditarem na minha capacidade e por apoiarem meus sonhos, tanto emocionalmente como financeiramente, foram as pessoas mais importantes para conclusão dessa fase. Amo vocês

inconcionalmente, que nada possa abalar nossa união e fé, obrigado pelos exemplos de simplicidade e humildade, e por me ensinarem que o mais importante é ver o lado positivo das situações e seguir sorrindo e acreditando, semeando esperança e alegria no coração de cada um que cruza nossos caminhos. Essa é a missão da nossa família, afinal “tirando as coisas ruins ficam só as boas” certo paizão. Aos demais familiares que de certa forma apoiaram e ajudaram, que também são muito importantes.

A Deus e Nossa Senhora, a quem nos momentos de total desespero eu recorria, e com um suspiro retirava minha maior força.

A vida dos animais, pois, graças a esses estudos experimentais conseguimos descobrir melhorias importantes para saúde animal e humana.

A todos que ajudaram e apoiaram de alguma maneira para a realização deste trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigado!

*" Perfer et obdura;
dolor hic tibi proderit olim"*

Ovid

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Tecido adiposo, leptina e obesidade	3
2.2. Diabetes	5
2.4. Implicações da diabetes e obesidade na proteomica reprodutiva	10
2.5. Citocinas	12
REFERÊNCIAS.....	16
HIPÓTESE.....	25
OBJETIVO GERAL.....	27
ARTIGO 1.....	2

RESUMO

ASPECTOS REPRODUTIVOS DE RATOS OBESOS E DIABÉTICOS. Botucatu - SP. 2018, p.120. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A obesidade e o diabetes têm alto índice mundial, ambas ligadas a infertilidade em diferentes espécies e em humanos. Pretende-se investigar os efeitos dessas doenças sobre a capacidade reprodutiva e o perfil proteico de células espermáticas. Foram utilizados 30 ratos *Rattus norvegicus* (Wistar) com ~50 dias de idade, separados em 3 grupos: controle (n=10), diabéticos (n=10) e (obesos (n=10). O grupo obeso recebeu dieta de cafeteria e água *ad libitum* com 5% de sacarose, por 38 semanas. Os animais foram pesados uma vez por semana, para avaliação da evolução do peso para cálculo do índice de Lee. Foi induzida diabetes, com aplicação de 35 mg/kg de estreptozotocina, dose única, e foram considerados diabéticos animais com perda de peso corporal e níveis de glicemia maiores ou iguais a 120 mg/dL. Houve aumento e diminuição do peso corporal nos grupos obesos e diabéticos respectivamente. Os animais diabéticos apresentam aumento significativo no índice glicêmico. Quanto às alterações sistêmicas houve aumento da leptina no grupo obeso e redução da adiponectina nos diabéticos. Na citologia testicular houve aumento na concentração de das linhagens finais da espermatogênese, aumento das células de Sertoli, e na morfologia houve redução de células normais nos grupos diabéticos e obesos. As variáveis foram normalizadas e analisadas pelo ANOVA *one way*, e comparações múltiplas pelo teste Newman-Keuls, os resultados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão (SEM), com $P \leq 0,05$. Na análise proteômica, foram identificadas 15 proteínas como importantes na separação dos grupos, 14 encontravam-se menos expressas no grupo diabético e 7 obeso. Apenas 1 proteína foi mais expressa no grupo diabético e 8 no obeso. A maioria dessas proteínas foram relacionadas com a produção de ATP e função estrutural. Quanto as avaliações das concentrações de IL-8, testosterona, histologia testicular e peroxidação lipídica, não apresentaram diferenças estatísticas. Há poucos trabalhos com proteômica de espermatozoide frente a obesidade e diabetes. Foram relatadas proteínas não identificadas em estudos anteriores. Assim, essas descobertas podem tornar-se marcadores úteis da fertilidade.

Palavra-chave: Obesidade, diabetes, reprodução, citocina, proteômica.

ABSTRACT

GOMIDES, M.C. REPRODUCTIVE ASPECTS OF OBESE AND DIABETIC RATS. Botucatu - SP. 2019, p.120. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Obesity and diabetes have a high worldwide index, both linked to infertility in different species and in humans. It is intended to investigate the effects of these diseases on the reproductive capacity and protein profile of sperm cells. A total of 30 *Rattus norvegicus* (Wistar) rats at ~50 days of age were divided into three groups: control (n = 10), diabetics (n = 10) and obese (n = 10) and water ad libitum with 5% sucrose for 38 weeks. The animals were weighed once a week to evaluate the evolution of the weight for the Lee's index calculation. Diabetes was induced with application of 35 mg / kg streptozotocin, and diabetic animals with a loss of body weight and glycemia levels greater than or equal to 120 mg / dL were observed to be diabetic, with increased and decreased body weight in the obese and diabetic groups, respectively. As for the systemic alterations, there was an increase in leptin in the obese group and reduction of adiponectin in diabetics. In the testicular cytology there was an increase in the concentration of the final spermatogenesis lines, increase of Sertoli cells, and in the morphology there was reduction of normal cells in the diabetic and obese groups. The variances were normalized and analyzed by ANOVA one way, and multiple comparisons by the Newman-Keuls test, the results were presented as means $\pm$ standard error (SEM), with $P \leq 0.05$. In the proteomic analysis, 15 proteins were identified as important in the separation of the groups, 14 were less expressed in the diabetic and 7 obese groups. Only 1 protein was more expressed in the diabetic group and 8 in the obese group. Most of these proteins were related to the production of ATP and structural function. Regarding the concentrations of IL-8, testosterone, testicular histology and lipid peroxidation, there were no statistical differences. There are few works with sperm proteomics against obesity and diabetes. Unidentified proteins have been reported in previous studies. Thus, these findings can become useful markers of fertility.

Key words: Obesity, diabetes, reproduction, cytokine, proteomics.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente, em humanos estima-se que a infertilidade atinja 10% a 20% dos casais em idade reprodutiva, e em aproximadamente 30% dos casos a infertilidade é causada apenas por fatores masculinos, enquanto que em 20% têm causas masculinas e femininas combinadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010) estima-se que aproximadamente 80 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentam o problema, sendo a obesidade, uma das doenças que predispõem a infertilidade no homem.

Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), a obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo, causada pela predisposição genética, maus hábitos alimentares ou disfunção endócrina. O diagnóstico da obesidade é realizado pelo índice de massa corporal (IMC), parâmetro utilizado pela OMS. A obesidade é caracterizada por ser um importante fator de risco para outras doenças, entre estas hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (PEDERSEN, 2013).

A OMS aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso, e mais de 700 milhões obesos, sendo esses índices maiores entre homens. No Brasil, a obesidade vem crescendo a cada dia e segundo a Associação para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO, 2009), alguns levantamentos apontam que mais de 50% da população está acima do peso normal, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade.

As implicações genéticas na ocorrência de obesidade são raras, sendo originada por diversos fatores, como alterações ambientais e comportamentais (MALIK, HU, 2012; NASCIMENTO et al., 2008). Por esse motivo modelos experimentais poligênicos de obesidade induzida por dietas, são, preferencialmente utilizados, mimetizando a fisiopatologia da doença em humanos e outros animais, levando a melhor compreensão da síndrome metabólica e potenciais tratamentos (BROWN, PANCHAL, 2011; NILSSON et al., 2012).

Em vista da importância da obesidade e das comorbidades associadas, incluindo a síndrome metabólica, sobre a fertilidade masculina, este estudo tem como objetivo identificar os efeitos da doença sobre a capacidade reprodutiva de ratos obesos ou diabéticos e no perfil proteômico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Tecido adiposo, leptina e obesidade*

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo frouxo específico, no qual há o predomínio de células arredondadas denominadas adipócitos, que acumulam no citoplasma gotículas de lipídios, os triglicerídeos, os quais são fonte de energia. Estas células são margeadas por uma rede de capilares e nervos, atuando no sistema endócrino e possuem papel metabólico importante, responsável pela secreção de diversas proteínas. Este tecido está localizado abaixo da derme, auxiliando na manutenção da temperatura corporal e contra choques mecânicos. Em homens, o ideal é que este tecido corresponda a 20% do peso corporal (MARQUES, LANGOUCHE, 2013).

O tecido adiposo é considerado o maior órgão endócrino do organismo. Secreta adipocinas, cujo excesso está relacionado com a obesidade e resistência à insulina. O aumento da adiposidade antagoniza a função da insulina e assim a absorção e o armazenamento de nutrientes, já que a glicose circulante não fica disponível para células (HOLLAND et al., 2007).

A leptina foi a primeira adipocina identificada em meados de 1994, envolvida na regulação da massa corporal, agindo no hipotálamo. Em pessoas obesas, a leptina, está relacionada com o aumento da adiposidade, atuando diretamente no metabolismo da glicose (MOSCHOS, CHAN, MANTZOROS, 2002; OUCHI et al., 2011; SINGLA, BARDOLOI, PARKASH, 2010; ZHANG et al., 1994).

A leptina é uma proteína de 16 kDa, produto do gene obeso (ob), tendo origem principalmente no tecido adiposo. Possui receptores localizados em regiões do cérebro (OB-R1), no tecido adiposo e gônadas (OB-Rs). Mutações na leptina ou seus genes receptores podem causar obesidade mórbida, infertilidade e resistência à insulina, tanto em roedores quanto em humanos (EHRHARDT et al., 2001; HOUSEKNECHT, PORTOCARRERO, 1998).

A expressão do mRNA da leptina em humanos e roedores, e seu nível no sangue estão correlacionados com a adiposidade. Há evidências de que exista uma importante ação da insulina na regulação da expressão da leptina, levando ao aumento da proteína, enquanto a leptina reduz a produção de insulina no pâncreas, estabelecendo um mecanismo de *feedback* negativo entre insulina e leptina (HOUSEKNECHT et al., 2000).

A leptina atua no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, fazendo a conexão entre a condição nutricional e a reprodução. Está presente nos testículos, atuando como

sinalizadora do metabolismo, indicando que há reservas energéticas. Esse mecanismo ainda não está totalmente estabelecido, mas acredita-se que exista ação em diversos locais do eixo, e a hiperleptinemia (resistência a leptina) (DUDAS, MERCHENTHALER, 2006; FERNANDEZ et al., 2011; KRAEMER et al., 2001; SMITH et al., 2005), pode inibir a secreção esteroidal, prejudicando a função das células de Leydig e a secreção hormonal. Estas alterações podem comprometer o desenvolvimento da função sexual em humanos, levar ao hipogonadismo e ao diabetes tipo 2 (ISIDORI et al., 1999; MICHALAKIS et al., 2012; SPICER, 2001) .

O hipogonadismo (deficiência funcional das gônadas) interfere na produção de andrógenos pelos testículos, e está relacionada a níveis baixos de testosterona. Quanto maior o grau de obesidade, maior a inibição testicular, menor os valores de testosterona total e produção de espermatozoides (DUDAS, MERCHENTHALER, 2006; FERNANDEZ et al., 2011; KRAEMER et al., 2001; SMITH et al., 2005).

A adiponectina, outra adipocina, foi inicialmente identificada no soro de camundongos na década de 90 (SCHERER et al., 1995), é uma proteína ativa e secretada por adipócitos que desempenha um papel importante na homeostase energética (LINDSAY et al., 2002). Ao contrário da leptina que tem regulação positiva, a adiponectina possui ação negativa, em processos fisiológicos e na obesidade, como catabolismo de glicose e ácidos graxos para obtenção de energia e ação da insulina regulada negativamente em resposta a queda dessa adipocinas (SCHERER, 2006). Os receptores (AdipoR1 e AdipoR2) da adiponectina estão localizados nas células endoteliais do cérebro, no hipotálamo (CHUNG et al., 2014; KIM et al., 2007; YAMAUCHI et al., 2003).

A adiponectina estimula a proliferação e sobrevivência celular, diminuindo a apoptose e estresse oxidativo durante a espermatogênese, em vista do maior transporte de substratos energéticos como glicose e lactato, aumentando a concentração espermática (KASIMANICKAM et al., 2013). Receptores da adiponectina já foram encontrados em células de Sertoli e Leydig de frangos, (OCÓN-GROVE et al., 2008) e em todo o epidídimo de carneiros, atuando na maturação espermática (RAHMANIFAR, TABANDEH, 2012). Em bovinos, as concentrações da adiponectina e a expressão do seu mRNA foram maiores em animais com maior fertilidade (KASIMANICKAM et al., 2013). Já em camundongos o tratamento com adiponectina tem ação anti-inflamatória podendo prevenir a disfunção testicular induzida por citocinas pró-inflamatórias (WU et al., 2013).

Na obesidade há uma diminuição da adiponectina sugerindo (CARMINA et al., 2005), ação moduladora na regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, podendo resultar no aumento de LH e redução de GnRH (RAK et al., 2017). Acredita-se que a adiponectina tenha relação com a redução do potencial reprodutivo (KASHOU, PLESSIS, AGARWAL, 2012), já que está diretamente correlacionada com a homeostase energética e com algumas vias de sinalização dos *transporter glucose* (GLUT) importantes na espermatogênese. Desta maneira, adiponectina e leptina estão fortemente relacionadas com a atividade gonadal, com o papel autócrino e parácrino, regulando as vias de sinalização para que as funções reprodutivas sejam executadas (RATO et al., 2012).

2.2. Diabetes

O termo diabetes *mellitus* descreve o distúrbio metabólico com diversas etiologias, alterando o metabolismo de proteínas, gorduras, carboidratos, devido a danos na ação e/ou secreção da insulina (ALBERTI, ZIMMET, 1999; ROGLIC et al., 2005).

O diabetes é uma doença com elevada incidência e de abrangência mundial, cuja prevalência é de 5,83% em pessoas com idades entre 20 e 79 e está 4º lugar como causa de mortes anuais (RITCHIE, ROSER, 2018). Segundo a OMS (2016), estima-se que até 2.030, seja considerada uma epidemia, estando em 7º lugar na causa de mortes anuais, e em 2.040 esse número seja 4 vezes maior, atingindo 642 milhões de brasileiros.

Existem dois tipos principais, o diabetes tipo 2, uma doença metabólica causada por alto índice de glicose no sangue, o qual é a grande maioria dos casos, caracterizada pela deficiência na ação da insulina, denominada de resistência à insulina, e o agravamento da doença leva a uma queda real na produção de insulina. Geralmente acomete indivíduos obesos, com forte predisposição genética. Já a diabetes tipo 1, doença crônica autoimune, é causada pela apoptose das células β -pancreáticas, caracterizando a deficiência na produção de insulina, com alguma predisposição genética, acometendo no geral crianças e adultos jovens (SBEM, 2014).

A insulina é produzida no pâncreas pelas células β , localizadas nas ilhotas de *Langerhans*, sensíveis a glicose presentes na circulação sanguínea (Figura 1). Essas células possui a proteína *transporter glucose-2* (GLUT2), através da qual ocorre o aporte e entrada desse nutriente até as células. Nas células, a glicose sofre glicólise para a formação de ATP, levando ao fechamento dos canais de potássio que levam a despolarização da membrana celular, abertura dos canais e entrada de cálcio no meio

intracelular, promovendo a liberação e síntese de insulina na corrente sanguínea, que nesse momento se junta à glicose circulante (Figura 2) (MATSCHINSKY, 1996; PERALES, SENER, MALAISSE, 1988; PRENTKI, CORKEY, 1996).

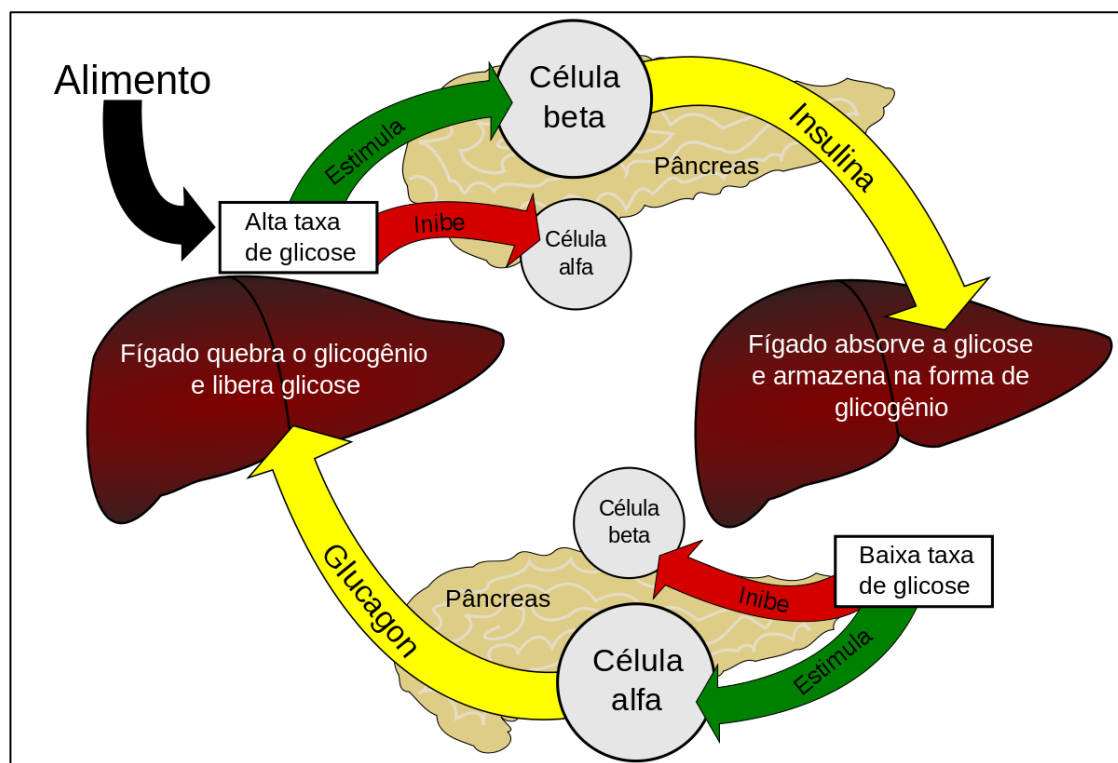


Figura 1. Ação moduladora das taxas de glicose sérica pela insulina e glucagon. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Glicemia>

A glicose é a principal fonte de energia dos tipos celulares de mamíferos. É uma molécula grande e polar, que não ultrapassa diretamente a membrana, sendo dependente do estímulo adequado da insulina (BELL et al., 1990). Para isso, nessas células alvo, existem proteínas transmembrana receptoras, como a *ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1* (ENPP-1) que possui uma subunidade α (extracelular) e uma β (intracelular), responsável pelo reconhecimento da insulina, permitindo sua entrada na célula. Outras proteínas da família da *insulin receptor substrate* (IRS) fosforilam a molécula de insulina, ativando uma cascata de resposta que atua na *transporter glucose 4* (GLUT4) permitindo que a glicose entre na célula do tecido alvo. Dentro da célula, as moléculas de glicose se combinam formando o glicogênio, e outras moléculas de glicose recebem elétrons originando o piruvato, metabolizado na mitocôndria liberando energia no ciclo de Krebs (CHANDALIA et al., 2012; PAN et al., 2011; TUMURBAATAR et al., 2017).

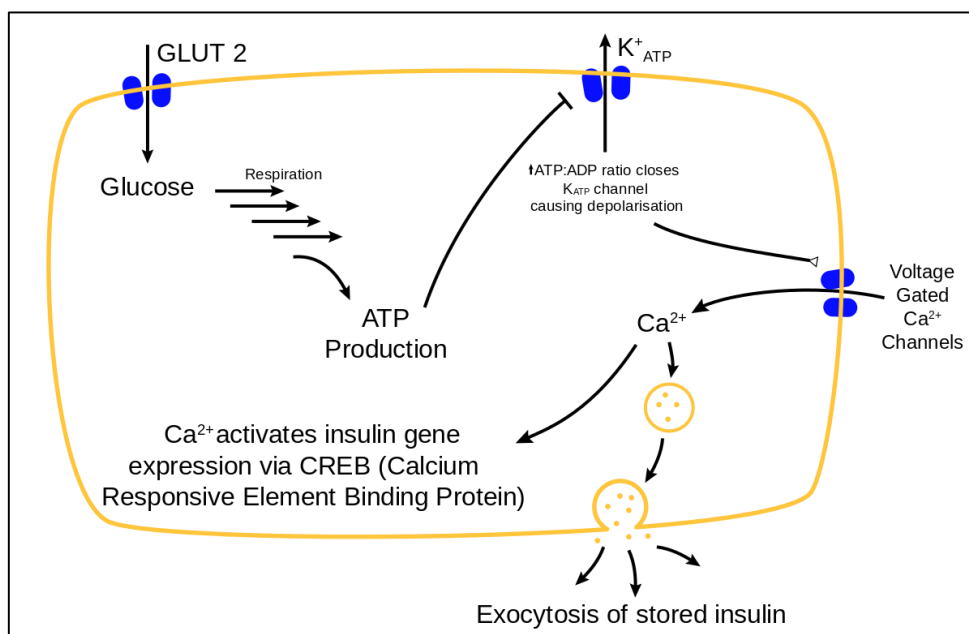


Figura 2. Mecanismo de liberação da insulina. Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Regulagem_da_glicemia.

Quando esse mecanismo (entrada da glicose na célula) é afetado pela ausência ou ação da insulina, compromete a síntese de glicogênio e proteínas, gliconeogênese e glicólise, que são importantes fontes de energia no tecido músculo-esquelético (glicogênio) e no tecido adiposo (triglicerídeos). Mudanças na concentração ideal da insulina é um fator de risco para doenças como hipertensão, aterosclerose, hiperglicemia, doenças cardiovasculares, câncer, insuficiência renal, retinopatia, neuropatia e disfunção sexual (HOLLAND et al., 2007).

Os estudos tem apontado maior ocorrência do diabetes *mellitus* em homens no auge de sua fase reprodutiva, por isso busca-se uma relação com a infertilidade masculina (PETROIANU et al., 2009; PONTES et al., 2011; SINGLA, BARDOLOI, PARKASH, 2010). O diabetes pode produzir disfunção erétil e ejaculação retrógrada em homens (ANDERSON et al., 1993; RODRIGUEZ-RIGAU, 1980).

O papel da célula espermática consiste na transferência do DNA haploide masculino para o DNA feminino (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007), capacidade fecundante, que garanta sua funcionalidade ao longo do trato genital da fêmea para fusão dos gametas (ANDÒ, AQUILA, 2006; AQUILA et al., 2005). Isso demanda gasto de energia principalmente para manter sua motilidade, capacitação e reação acrossômica, havendo muito consumo de ATP, sendo que sua principal fonte energética provem de

açúcares como a glicose, adquiridas pelas vias metabólicas, glicólise e a fosforilação oxidativa. Essas células são compostas por uma bainha mitocondrial localizada na peça intermediária, local onde ocorrem esses processos, catabólicos e balanço iônico (VAN TILBURG et al., 2008).

As GLUTs também estão presentes em diferentes tipos celulares, incluindo as células espermáticas. Estas proteínas são responsáveis pelo transporte dependente de insulina da glicose nos espermatozoides (AQUILA et al., 2005). Em humanos a GLUT1, GLUT2, GLUT3 (ANGULO et al., 1998), GLUT4, GLUT5 (BUCCI et al., 2011), GLUT8 (AUGUSTIN, RILEY, MOLEY, 2005) e GLUT9 (MANOLESCU et al., 2007) estão distribuídas em diferentes porções da célula espermática, incluindo a cabeça (acrossomo) e cauda (peça central e principal), como demonstrado na figura 3. O espermatozoide produz insulina, a qual é responsável pela modulação autócrina da glicose, via fosfato pentose e atividade da enzima *glucose-6-phosphate dehydrogenase* baseado na necessidade energética das células, independente da insulina sistêmica (AQUILA et al., 2005). Esse mecanismo está envolvido na indução da capacitação espermática (ANDÒ, AQUILA, 2006). Além disso, sugere-se que a insulina pode ser usada como componentes de meios diluentes para crioproteção espermática (AQUILA et al., 2005; VAN TILBURG et al., 2008).

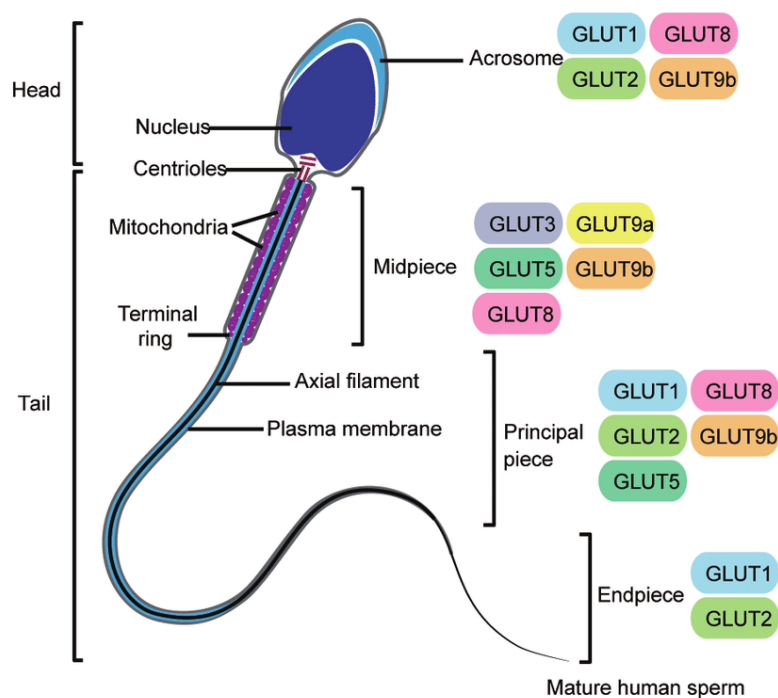


Figura 3. Representação da localização dos transportadores de glicose em todas as partes do espermatozoide. Fonte: (DING et al., 2015).

Outras alterações causadas pela queda da insulina na estrutura das células espermáticas são alterações na membrana plasmática, acrossomo, e mitocôndria, observadas por microscopia eletrônica (BACCETTI et al., 2002).

Receptores de insulina também já foram observados nas células somáticas testiculares, como as células de Sertoli, as quais são dependentes da metabolização de substratos como a glicose (BOUSSOUAR, BENAHMED, 2004; GRISWOLD, 1998). Este processo é controlado por insulina e testosterona. Essas células possuem capacidade de produzirem lactato anaeróbico por glicólise (glicose), para manutenção de ATP, em vista de seu uso exacerbado para obtenção de energia em células germinativas (espermátócito e espermátides) (JUTTE et al., 1981; RIERA et al., 2002), além disso o lactato também possui efeito anti-apoptótico (ERKKILA et al., 2002).

Estudos demonstram que a privação de insulina *in vitro* nas células de Sertoli leva a diminuição do consumo de glicose e, conseqüentemente, da secreção de lactato. Os níveis de transcrição de genes associados com o metabolismo do lactato foram diminuídos, juntamente com genes envolvidos na captação de glicose (OLIVEIRA et al., 2011, 2012). Além disso, a infusão intra-testicular de lactato aumenta a espermatogênese de ratos e esse mecanismo é afetado pela ausência ou inatividade da insulina, conseqüências advindas do diabetes mellitus (COURTENS, PLÖEN, 1999).

Outras alterações ocorrem também em gonadotrofinas hipofisárias. Normalmente o hormônio folículo-estimulante (FSH) regula as funções da célula de Sertoli, necessárias para a maturação espermática normal e o hormônio luteinizante (LH) controla as funções das células de Leydig a secretarem testosterona (KIANIFARD, SADRKHANLOU, HASANZADEH, 2012). Vem sendo relatado que a insuficiência ou comprometimento da ação reguladora da insulina nas células de Leydig e Sertoli, leva a alterações importantes em pacientes diabéticos, pois atua nas funções endócrinas dos testículos que são controlados pelas gonadotrofinas.

A função de maior importância da insulina, é a modulação dos níveis de FSH no sangue, e sua diminuição é descrita em experimentos com ratos diabéticos. Como o FSH atua sinergicamente com o LH seus níveis também são reduzidos, com isso há uma diminuição dos números de células de Leydig, levando a baixa produção de testosterona, esses efeitos afetam a proliferação e metabolismo celular que alteram a espermatogênese, acarretando produção insuficiente de espermatozoides (CAI et al., 2000; CORONA et al., 2011; OKSANEN, 1975; ORTH, MURRAY, BARDIN, 1979; OZDEMIR, PEKER-AKALIN, BASPINAR, 2009; RATO et al., 2015). Outra conseqüência descrita em

resposta ao declínio da testosterona é diminuição do peso testicular e dos órgãos sexuais (KARIMI et al., 2012).

Além das alterações hormonais associadas com o índice glicêmico elevado, também ocorre aumento do estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio na geração de radicais livres com capacidade oxidante e antioxidante, levando a alterações como, peroxidação lipídica, fragmentação do DNA nuclear e mitocondrial dos espermatozoides e oxidação de diferentes moléculas que causam danos à membrana plasmática (BARBOSA et al., 2010). Os danos à membrana alteram a permeabilidade, fluidez e integridade celular (AUST et al., 2001). Essas alterações espermáticas, especialmente os danos ao DNA, levam a infertilidade ou ineficiente mecanismo de reparo do DNA, podendo ser a causa para defeitos mutagênicos no embrião (LECHLEITNER et al., 2000; LIMA, ABDALLA, 2001).

Os antioxidantes presentes no sêmen são potentes agentes antiglicantes protegendo contra os produtos da glicação avançada (AGE) (MALLIDIS et al., 2007, 2009). Mudanças na expressão dos AGES pode ser a causa para o aumento dos receptores para os produtos finais da glicação avançada (RAGE), descritos em complicações relacionadas ao diabetes, resultando em respostas inflamatórias com a liberação de citocinas (YAN et al., 2009). Estudos demonstram correlação positiva entre o aumento de AGES, produtos da peroxidação lipídica e danos ao DNA, sugerindo um papel fundamental nos distúrbios espermáticos de homens diabéticos, já que a ativação do RAGE aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e isso leva a fragmentação do DNA (KARIMI et al., 2012; MALLIDIS et al., 2009).

2.4. Implicações da diabetes e obesidade na proteômica reprodutiva

A obesidade, diabetes e associação dessas duas enfermidades pode alterar o perfil proteômico das células espermáticas. Kriegel et al. (2009) estudaram diabéticos tipo 1, obesos não-diabéticos e homens férteis clinicamente saudáveis. Foram encontradas 7 proteínas espermáticas associadas com o grupo diabetes tipo 1 (*prolactin-induced protein, A-kinase anchoring protein 4, annexin A1, mitochondrial ferritin, hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 10 isoform 1, importin subunit β -3 [karyopherin β -3, ran-bindingprotein 5, RanBP5]* e *semenogelin 1 preproprotein*) e 9 associadas à obesidade (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic, outer dense fibre protein 1, glycerol kinase, testis specific 1, semenogelin 2, fibrinogen-like 1 precursor, glutathione*

S-transferase x 2, lysozyme-like protein 1 precursor, chromosome 9 open reading frame 24 e outer dense fibre protein 1).

O perfil proteico de espermatozoides de homens obesos não-diabéticos (n = 13), diabéticos tipo 1 (n = 8), diabéticos tipo 2 (n = 7) e normozoospermicos (n = 21) identificou 3.187 *spots* e 79 diferenciais. Após a espectrometria de massas, foram identificados níveis diferenciados de 12, 71 e 13 proteínas no proteoma dos grupos diabetes tipo 1, tipo 2 e obesos não-diabéticos, respectivamente. Além disso, uma forma molecular da *semenogelin-1*, uma da *clusterin* e duas da *lactotransferrin*, que fazem parte do complexo *eppin* (*epididymal proteinase inhibitor*), cuja funções estão correlacionadas com a fertilização, proteção espermática, regulação da motilidade e reação do acrossomo, foram elevadas nos mesmos grupos. Este aumento foi associado com a resposta à hiperglicemia e ao estresse oxidativo. A proteína *β -galactosidase-1* apresentou-se diminuída em todos os grupos, exceto nos homens normozoospermicos (PAASCH et al., 2011). A *β -galactosidase-1* possui atividade de glicosil hidrolase e está em abundância na cauda do epidídimo, sugerindo que seu papel seja o de alterar glicoproteínas na superfície da célula espermática durante a maturação (DACHEUX et al., 2005).

Em ratos (Sprague-Dawley) com obesidade induzida por dieta hiperlipídica foram encontradas 6.795 proteínas no tecido testicular, sendo 107 expressas diferencialmente. Destas proteínas, 67 foram *downregulated* e 40 *upregulated* no grupo tratado. As proteínas mais relevantes foram relacionadas às funções antioxidantes, importantes para a espermatogênese. A *spink2* (serine protease inhibitor Kazal-type 2) foi *upregulated* no grupo tratado, sugerindo um mecanismo compensatório, já que a proteína pertence à família das proteínas *spinks*, inativa a acrosina durante a maturação espermática, na qual esta é transportada do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. Na ausência da *spink2*, há uma desorganização do complexo de Golgi, o acrossoma não é formado e a espermatogênese é interrompida na fase de espermátide redonda. Já a *CRISP-1*, da família das *cysteine-rich secretory protein* (CRISP) estava *downregulated* no grupo tratado. Esta proteína é incorporada ao espermatozoide durante a maturação no epidídimo e está envolvida na fertilização, o que justifica as menores concentrações em ratos tratados (XIU-YAN et al., 2018).

O perfil proteico de espermatozoides de humanos obesos com astenozoospermia foi comparado a homens normais. Foram encontradas 1.975 proteínas, sendo que em 127 a expressão foi diferencial. Destas proteínas identificadas, 105 estavam *downregulated* e 22 *upregulated*. As proteínas com expressão diferenciada foram divididas em subgrupos.

O subgrupo 1 foi composto por 18 proteínas relacionadas com o citoesqueleto, o subgrupo 2, 14 proteínas envolvidas no sistema de endomembrana (vesículas associadas ao complexo de golgi e retículo endoplasmático) e o subgrupo 3, 14 proteínas associadas com o metabolismo celular. Além disso, proteínas como a *endoplasmic reticulum chaperone*, *protein disulfide isomerase* (ERp57), *actin-binding proteins* foram *downregulated* nos obesos e estão associadas com a fertilidade e motilidade espermática (LIU et al., 2014).

2.5. Citocinas

Hipertrofia do tecido adiposo induz a infiltração e proliferação de macrófagos e alteração na secreção de adipocinas levando à inflamação crônica de baixa intensidade. Este quadro, associado ao aumento de ácidos graxos livres circulantes, provoca aumento de ingestão alimentar, diminuição do gasto energético, além da alteração na homeostase de tecidos periféricos, como músculo e fígado, promovendo acúmulo ectópico de gordura, inflamação e resistência à insulina (SPERETTA, LEITE, DUARTE, 2014).

Citocinas são proteínas que modulam a resposta celular imune e inflamatória pela regulação da proliferação, diferenciação e atividade celular (ANDERSON et al., 1993; KELLY, 2001). A obesidade e o diabetes foram relacionados com o nível circulante de citocinas e proteínas associadas com a resposta inflamatória sistêmica (PICKUP, FRCPATH, 2004; WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2005).

Apesar da obesidade e diabetes serem enfermidades diferentes e independentes, podem coexistir, e o aparecimento do diabetes ocorre frente à obesidade. Durante a obesidade há um acúmulo de tecido adiposo em diferentes órgãos, incluindo o testículo. Os adipócitos possuem capacidade secretória de citocinas (BULLÓ et al., 2003; TRAYHURN, 2007) e isso tem sido relacionado com a síndrome metabólica que causa desordem no organismo, levando a estados crônicos (YUDKIN et al., 1999). Este acúmulo induz a infiltração e proliferação de células do sistema imune (macrófagos) e diminui a secreção de adiponectina e aumenta de leptina. Estas alterações induzem a reação inflamatória crônica e de baixa intensidade. Os macrófagos produzem fator de necrose tumoral (TNF- α) (ROSE; KOMNINO, STEPHENSON, 2004), que são citocinas responsáveis por mediar a ação da interleucina 6 (IL-6) (CALLE, KAAKS, 2004; CHIELLINI et al., 2002). Juntas, as citocinas (TNF- α e IL-6) ativam outras vias pró-inflamatórias (WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2005) e quando elevadas, em modelos com obesidade induzida e/ou diabetes, mediam a resistência à insulina. Além disso,

quando as citocinas são neutralizadas parece haver alteração (COPPACK, 2001) ou diminuição da taxa de fosforilação, impedindo a insulina de translocar o GLUT4/substrato do receptor (IRS-1) (HOTAMISLIGIL, SHARGILL, 1993), impedindo a entrada de glicose na célula.

As citocinas estão também relacionadas com as adipocinas como a leptina e a adiponectina (WEISBERG et al., 2003). A leptina leva ao recrutamento de linfócitos T, frente ao processo pró-inflamatório (LORD et al., 1998; MARTI, MARCOS; MARTINEZ, 2001). Além disso, há uma correlação positiva entre a concentração de TNF- α e IL-6 (citocinas pró-inflamatórias) com a da leptina, mediando a hiperleptinemia na obesidade (FRUHBECK et al., 2001; SETHI, HOTAMISLIGIL, 1999). Também é descrito que as citocinas estimulam maior capacidade fagocitária dos macrófagos e o recrutamento de neutrófilos intensificando a resposta imune (WOLF et al., 2004).

As alterações nas adipocinas e nas citocinas são proporcionalmente relacionadas com o índice de massa corporal. Em vista disso, estas proteínas são consideradas mediadores do estado nutricional e podem ser uma ferramenta para o tratamento da obesidade (JELLEMA, PLAT, MENSINK, 2004). Além disso, estudos conduzidos em ratos e humanos são encontradas altas concentrações de TNF- α e IL-6 nos testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata, e uma correlação positiva com índice de massa corporal, indicando, que a inflamação advinda da obesidade, atua sobre a qualidade espermática.

As citocinas também são secretadas pelas células testiculares em condições normais, as quais atuam nas células Leydig, Sertoli, espermatozoides, e estão relacionados com produção de testosterona (CHAVARRO et al., 2010; HEDGER, 2002; HEDGER, MEINHARDT, 2003). A IL-6 e o TNF- α são produzidos pelas células Sertoli ou espermatogênicas, atuando de maneira cíclica na maturação do epitélio seminífero, sugerindo ações centrais nas funções testiculares (O'BRYAN, HEDGER, 2008). Atuam na barreira física hematotesticular e na regulação do eixo-hipotálamo-hipófise-gonadal. Nessas condições o funcionamento da fisiologia reprodutiva não é alterado, mas qualquer alteração na homeostase pode levar a infecção e inflamação, podendo culminar a infertilidade masculina (COHEN et al., 2002).

A interleucina IL-8 também é uma citocina e um potente quimiotático, proteína capaz de recrutar neutrófilos e linfócitos T para o espaço subendotelial. (GERSZTEN et al., 1990). Possui função também de inibir a expressão de metaloproteinases e quando esse mecanismo está desregulado há o aumento dessas endopeptidases (MOREAU et al.,

1999). A IL-8 também está aumentada em pacientes diabéticos (ZOZULINSKA et al., 1999). A IL-8 é produzida por adipócitos humanos (BRUUN et al., 2003; BRUUN, PEDERSEN, RICHELSEN, 2001) e há um aumento dos níveis plasmáticos da citocina em indivíduos obesos e diabéticos, possui as mesmas alterações e interações que as descritas anteriormente (STRACZKOWSKI et al., 2002; TROPF et al., 2017).

Como mencionado, a obesidade está associada com a diminuição da testosterona, concentração de espermatozoides, motilidade e danos ao DNA espermático (POZZA, ISIDORI, 2018). Na obesidade, a IL-8, uma citocina pró-inflamatória, pode ter influência na função espermática e no desenvolvimento de inflamação no testículo e próstata, havendo uma relação positiva entre o IMC, anormalidades na próstata (LOTTI et al., 2011).

2.7. Indução da Obesidade

As dietas de cafeteria possuem diferentes composições, ricas em carboidratos, gorduras, glicose, que em geral fornecem macronutrientes. Comumente são consideradas hiperglicídicas, levando as alterações na taxa de adiposidade e no metabolismo glicêmico, atribuído a palatabilidade, ocasionando uma hiperfagia por alimentação hedônica (por prazer), tendo como resultado o aumento acentuado do peso (HEYNE et al, 2009).

Atualmente, mediante a crescente industrialização e mecanização cada vez mais abundante na maioria dos países, levou a mudanças nos padrões comportamentais e alimentares da sociedade (LOPES, 2008), em resposta, os indivíduos se tornam cada vez mais sedentários. Além disso, houve um aumento no teor energético dos alimentos produzidos. Esses fatores vem sendo a causa do aumento abrupto da obesidade nos seus diferentes níveis, afetando a sobrevivência humana. (ENES, SLATER, 2010). Em busca de entender como essa doença e seu agravamento é causada por tais fatores, tem se usado as dietas de cafeteria em modelos experimentais, que mimetizam desequilíbrios como alteração do índice glicêmico, fonte principal para o surgimento das alterações metabólicas (PAWLAK, KUSHNER, LUDWIG, 2004).

Os protocolos utilizados para indução da obesidade em modelos experimentais, apresentam diferentes denominação, devido a grande variação na composição da dieta, apresentando também diferenças no tempo de indução para desenvolvimento da obesidade, caracterizado pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo. Demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Dietas utilizadas para indução da obesidade em ratos Wistar machos.

Denominação da dieta	Composição da dieta	Tempo de indução (semanas)	Artigo
Dieta de cafeteria	Amendoim, queijo, batatas fritas, biscoitos, salgadinhos de milho, bolachas, chocolates	12	Buyukdere; Gulec; Akyol, 2019
Dieta hiperlipídica	Manteiga, óleo de soja	12	Buyukdere; Gulec; Akyol, 2019
Dieta com alto índice glicêmico e carga (HGLI)	Ração comercial, leite condensado, açúcar refinado	17	Luz et al, 2018
Dieta rica em gordura (HFD)	Banha	10	Kindel et al., 2017
Dieta de cafeteria	Ração comercial, chocolate, amendoim e biscoito	5	Almeida et al, 2015
Dieta hiperlipidêmica	Ração comercial, Amendoim torrado, chocolate ao leite, bolacha mainzena	18	Ballestreri; Marcon; Tavares, 2015
Suplementação com sacarose	Sacarose dissolvida em água	13	Malafaia et al, 2013
Dieta de cafeteria	Bolacha recheada, Leite condensado, Salgadinho, Salsicha, Waffer, Refrigerante	5	Macedo et al, 2012
Dieta hipercalórica	Ração comercial, leite condensado, óleo de milho	8	Almeida et al, 2011
Dieta hiperlipídica	Ração comercial, Colesterol-dehydroepiandrosterone (DHEA) + frutose dissolvida em água	15	Aragno et al, 2009

2.7. Indução do Diabetes

A estreptozotocina é um derivado de nitrosourea monofuncional, um dos tipos de agentes alquilantes eletrofilicos que podem interagir covalentemente com regiões nucleofílicas (N-metil-N-nitrosourea), de moléculas orgânicas, como DNA. Esse agente alquilante foi isolado da bactéria *Streptomyces achromogenes*, capaz de metilar diretamente o DNA por ser genotóxico (BOLZAN; BIANCHI, 2002), causando aberrações cromossômicas e morte celular. Em específico destroem seletivamente as células β , das ilhotas de Langerhans (CISTERNAS, 2000), causando insuficiência

insulínica primaria do pâncreas por destruir sua parte endócrina (LERCO et al., 2003), por isso denominado como diabetogênica (BOLZAN; BIANCHI, 2002).

Para indução do diabetes químico com estreptozotocina, em modelos experimentais, são utilizadas diferentes doses/kg/vezes, assim como diferentes vias de aplicação, variando também os valores glicêmicos que caracterizam a doença. Além disso são descritos para indução dos dois tipos de diabetes (tipo1 e 2), como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Uso da estreptozotocina para indução do diabetes, em ratos Wistar machos.

Via de aplicação	Aplicação (mg/kg)	Aplicação (x)	Tipo de diabetes (1 ou 2)	Valores glicêmicos (mg/dL)	Artigo
Intraperitoneal	40	1	2	288	Magalhães et al, 2019
Intraperitoneal	50	1	1	300	Naderi et al, 2019
Intraperitoneal	100	1	2	200	Wietzycoski et al, 2016
Intraperitoneal	30	1	2	280	Quian et al, 2015
Intraperitoneal	45	1	--	--	Navarro-Casado et al, 2013
Intraperitoneal	60	1	--	--	Navarro-Casado et al, 2013
Intraperitoneal	35	1	2	198	Santos et al, 2012
Intraperitoneal	100	1	2	200	Rosa et al, 2011
Endovenosa	40	1	1	250	Silva et al, 2011
Intraperitoneal	75	3	1	120	Henriques et al, 2010
Intravenosa	40	1	1	250	Sales et al, 2010
Veia dorsal peniana	40	1	1	--	Oliveira et al, 2009
Subcutânea	45 e 25	2	1	350	Sugimoto; Yagihashi; 2002

REFERÊNCIAS

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. In: **Definintion, Dignosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications**. p. 49, 1999.

ANDERSON, J. J. et al. The Effects of Specific Medical Conditions on the Functional Limitations of Elders in the Framingham Study. **American Journal of Public Health**, v. 84, n. 3, p. 351–358, 1993.

ANDÒ, S.; AQUILA, S. Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 245, n. 1–2, p. 1–6, 2006.

ANGÉLOCO, L. R. N. et al. Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: Effects of high-fat and high-sucrose diets. **Revista de Nutricao**, v. 25, n. 3, p. 331–339, 2012.

ANGULO, C. et al. Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: Cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 189–203, 1998.

AQUILA, S. et al. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 552–557, 2005.

AUGUSTIN, R.; RILEY, J.; MOLEY, K. H. GLUT8 contains [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment. **Traffic**, v. 6, n. 12, p. 1196–1212, 2005.

AUST, O. et al. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and carotenoids. **Journal of Chromatography**, v. 936, n. 1–2, p. 83–93, 2001.

BACCETTI, B. et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human Reproduction**, v. 17, n. 10, p. 2673–7, 2002.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BELL, G. I. et al. Molecular Biology of Mammalian Glucose Transporters. **Diabetes Care**, v. 13, n. 3, p. 198–208, 1990.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. CORRELATION BETWEEN “LEE INDEX” AND CARCASS FAT CONTENT IN WEANLING AND ADULT FEMALE RATS WITH HYPOTHALAMIC LESIONS. **J. Endocr.**, v. 40, p. 527–528, 1967.

BJURSELL, M. et al. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 583–593, 2007.

BOUSSOUAR, F.; BENAHMED, M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 7, p. 345–350, 2004.

BROWN, L.; PANCHAL, S. K. Rodent models for metabolic syndrome research. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–14, 2011.

BRUUN, J. M. et al. Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n. 1, p. 8E–13, 2003.

BRUUN, J. M.; PEDERSEN, S. B.; RICHELSEN, B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1267–1273, 2001.

- BUCCI, D. et al. Gluts and mammalian sperm metabolism. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 4, p. 348–355, 2011.
- BULLÓ, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obesity Research**, v. 11, n. 4, p. 525–531, 2003.
- CAI, L. et al. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: Prevention by endothelin antagonism. **Urological Research**, v. 28, n. 5, p. 342–347, 2000.
- CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579–591, 2004.
- CAPRIO, M. et al. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. **Endocrinology**, v. 140, n. 11, p. 4939–4947, 1999.
- CHANDALIA, M. et al. Adipose tissue dysfunction in humans: A potential role for the transmembrane protein ENPP1. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 12, p. 4663–4672, 2012.
- CHAVARRO, J. E. et al. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 7, p. 2222–2231, 2010.
- CHEN, L. et al. DJ-1 deficiency attenuates expansion of liver progenitor cells through modulating the inflammatory and fibrogenic niches. **Cell death & disease**, v. 7, n. 6, p. e2257, 2016.
- CHIELLINI, C. et al. Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue via TNF α . **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, n. 2, p. 251–258, 2002.
- CHUNG, J. Y. et al. Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, p. 39, 2014.
- COPPACK, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 03, p. 349–356, 2001.
- CORONA, G. et al. Type 2 diabetes mellitus and testosterone: A meta-analysis study. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 6 PART 1, p. 528–540, 2011.
- COURTENS, J. L.; PLÖEN, L. Improvement of spermatogenesis in adult cryptorchid rat testis by intratesticular infusion of lactate. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 1, p. 154–61, 1999.
- DACHEUX, J. L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2 SPEC. ISS., p. 319–341, 2005.
- DALLAK, M. A. Suppression of High Fat Diet-Induced Liver Cell Injury by Swim Exercise Supresión de Lesión en Células de Hígado Inducida por Dieta Alta en Grasas con Ejercicio de Natación. **Int. J. Morphol**, v. 36, n. 1, p. 327–332, 2018.
- DELFINO, V. et al. Streptozotocin-induced diabetes mellitus : long-term comparison of two drug administration routes. **J Bras Nefrol**, v. 24, n. 1, p. 31–36, 2002.
- DING, G.-L. et al. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 6, p. 948–953, 2015.

DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTÂNASIA DO CONCEA: **Informação e documentação: citações em documento**. Brasília, 2013.

DUDAS, B.; MERCHENTHALER, I. Three-dimensional representation of the neurotransmitter systems of the human hypothalamus: Inputs of the gonadotrophin hormone-releasing hormone neuronal system. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 2, p. 79–95, 2006.

EHRHARDT, R. A. et al. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, n. 2, p. 85–96, 2001.

ERKKILA, K. et al. Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 2, p. 109–17., 2002.

FERNANDEZ, C. D. B. et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 32, p. 1–10, 2011.

FERRAZ, A. S. M. et al. Use of murinometrics indices and bioelectrical impedance (BIA) in the determination of experimental obesity in oophorectomized rats. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 451, 2016.

FRUHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 6, p. e827–e847, 2001.

GAROLLA, A. et al. Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. **Human Reproduction**, v. 30, n. 5, p. 1006–1013, 2015.

GERSZTEN, R. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, n. 6769, p. 718–723, 1990.

GLASS, A. R. et al. Low serum testosterone and sex-hormone-binding-globulin in massively obese men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 45, n. 6, p. 1211–1219, 1977.

GRIFFETH, R. J.; CARRETERO, J.; BURKS, D. J. Insulin Receptor Substrate 2 Is Required for Testicular Development. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1–11, 2013.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY**, v. 9, n. 4, p. 411–416, 1998.

GUASTI, P. N. et al. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 929, 2012.

HAVEL, P. J. et al. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. **American Physiology Society**, v. 274, n. 5, p. R1482–R1491, 1998.

HE, Q. et al. Metabolic syndrome, inflammation and lower urinary tract symptoms: Possible translational links. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, p. 1–7, 2015.

HEDGER, M. P. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 19–34, 2002.

HEDGER, M. P.; MEINHARDT, A. Cytokines and the immune-testicular axis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2003.

HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D. M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. S3, p. 39–50, 2013.

HOFNY, E. R. M. et al. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 2, p. 581–584, 2010.

HOLLAND, W. L. et al. Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 3, p. 167–179, 2007.

HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, S. B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HOUSEKNECHT, K. et al. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. **Journal of Endocrinology**, v. 164, p. 51–57, 2000.

HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: Regulators of whole-body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 457–475, 1998.

ISIDORI, A. M. et al. Leptin and androgens in male obesity: Evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 10, p. 3673–3680, 1999.

JELLEMA, A.; PLAT, J.; MENSINK, R. P. Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 34, n. 11, p. 766–773, 2004.

JIA, T. et al. The complex role of adiponectin in chronic kidney disease. **Biochimie**, v. 94, n. 10, p. 2150–2156, 2012.

JOPE, T. et al. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 335–341, 2003.

JUTTE, N. et al. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 399–405, 1981.

KADOWAKI, T.; KOHJIRO, U.; KAZUYUKI, T. Neonatal and child male circumcision: a global review. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 7, p. 1784–1792, 2006.

KANAZAWA, M. Y. et al. CORRELAÇÃO DA CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL, CITOLOGIA TESTICULAR E PARÂMETROS DO SÊMEN DO EPIDÍDIMO DE TOUROS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 517–527, 2012.

KARIMI, J. et al. Relationship between advanced glycation end products and increased lipid peroxidation in semen of diabetic men. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 91, n. 1, p. 61–66, 2011.

KARIMI, J. et al. Increased receptor for advanced glycation end products in spermatozoa of diabetic men and its association with sperm nuclear DNA fragmentation. **Andrologia**, v. 44, n. SUPPL.1, p. 280–286, 2012.

KASHOU, A. H.; PLESSIS, S. S. DU; AGARWAL, A. The Role of Obesity in ROS

- Generation and Male Infertility. In: **Springer Science & Business Media**, p. 670.
- KASIMANICKAM, V. R. et al. Associations of adiponectin and fertility estimates in Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 766–777, 2013.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.
- KELLY, D. A. The use of anti-interleukin-2 receptor antibodies in pediatric liver transplantation. **Pediatric Transplantation**, v. 5, n. 6, p. 386–389, 2001.
- KIANIFARD, D.; SADRKHANLOU, R. A.; HASANZADEH, S. The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 623–635, 2012.
- KIM, J.-Y. et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue Ja-Young. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 117, p. 2621–2637, 2007.
- KRAEMER, R. R. et al. Leptin and steroid hormone responses to exercise in adolescent female runners over a 7-week season. **European Journal of Applied Physiology**, v. 86, n. 1, p. 85–91, 2001.
- KRIEGEL, T. M. et al. Identification of diabetes- and obesity-associated proteomic changes in human spermatozoa by difference gel electrophoresis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 19, n. 5, p. 660–670, 2009.
- LECHLEITNER, M. et al. Tumour necrosis factor- α plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factors. **Journal of Internal Medicine**, v. 248, n. 1, p. 67–76, 2000.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.
- LINDSAY, R. S. et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. **The Lancet**, v. 360, n. 9326, p. 57–58, 2002.
- LIU, Y. et al. Proteomic pattern changes associated with obesity-induced asthenozoospermia. **Andrology**, v. 3, n. 2, p. 247–259, 2014.
- LORD, G. et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, n. AUGUST, p. 897–901, 1998.
- LOTTI, F. et al. Elevated body mass index correlates with higher seminal plasma interleukin 8 levels and ultrasonographic abnormalities of the prostate in men attending an andrology clinic for infertility. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 34, n. 10, p. e336–e342, 2011.
- MALAFIA, A. B. et al. OBESITY INDUCTION WITH HIGH FAT SUCROSE IN RATS. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 26, n. Suplemento 1, p. 17–21, 2013.
- MALIK, V. S.; HU, F. B. Sweeteners and risk of obesity and type 2 diabetes: The role of sugar-sweetened beverages. **Current Diabetes Reports**, v. 12, n. 2, p. 195–203, 2012.

- MALLIDIS, C. et al. Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: Prevalence in men with diabetes mellitus. **Human Reproduction**, v. 22, n. 8, p. 2169–2177, 2007.
- MALLIDIS, C. et al. The influence of type 1 diabetes mellitus on spermatogenic gene expression. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 6, p. 2085–2087, 2009.
- MANFREDI-LOZANO, M.; ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. **Frontiers in Neuroendocrinology**, n. May, p. 0–1, 2017.
- MANOLESCU, A. R. et al. A highly conserved hydrophobic motif in the exofacial vestibule of fructose transporting SLC2A proteins acts as a critical determinant of their substrate selectivity. **Molecular Membrane Biology**, v. 24, n. 5–6, p. 455–463, 2007.
- MARQUES, M. B.; LANGOUCHE, L. Endocrine, metabolic, and morphologic alterations of adipose tissue during critical illness. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 1, p. 317–325, 2013.
- MARTI, A.; MARCOS, A.; MARTINEZ, J. Obesity and immune function relationships. **Obesity Reviews**, v. 2, n. 2, p. 131–140, 2001.
- MATSCHINSKY, F. M. A Lesson in Metabolic Regulation Inspired by the Glucokinase Glucose Sensor Paradigm Franz. **Diabetes**, v. 45, p. 223–241, 1996.
- MICHALAKIS, K. et al. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. **Developments in ophthalmology**, v. 62, n. 4, p. 457–478, 2012.
- MOREAU, M. et al. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages. **Circulation**, v. 99, n. 3, p. 420–426, 1999.
- MOSCHOS, S.; CHAN, J.; MANTZOROS, C. Leptin and reproduction: a review. **Fertility and Sterility**, v. 77, n. 3, p. 1–15, 2002.
- NASCIMENTO, A. F. et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 52, n. 6, p. 968–974, 2008.
- NAVARRO-CASADO, L. et al. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 6, p. 584–592, 2010.
- NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121–142, 2005.
- NILSSON, C. et al. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 173–181, 2012.
- NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, 2007.
- O'BRYAN, M. K.; HEDGER, M. P. INFLAMMATORY NETWORKS IN THE CONTROL OF SPERMATOGENESIS CHRONIC INFLAMMATION IN AN IMMUNOLOGICALLY PRIVILEGED TISSUE? In: **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**, v. 636, p. 92–114.

OCÓN-GROVE, O. M. et al. Adiponectin and its receptors are expressed in the chicken testis: Influence of sexual maturation on testicular ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA abundance. **Reproduction**, v. 136, n. 5, p. 627–638, 2008.

OKSANEN, A. Testicular Lesions of Streptozotocin Diabetic Rats. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 6, n. 3, p. 138–144, 1975.

OLIVEIRA, P. F. et al. Influence of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. e612–e620, 2011.

OLIVEIRA, P. F. et al. Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolism-associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 2, p. 84–89, 2012.

ORTH, J. M.; MURRAY, F. T.; BARDIN, C. W. Ultrastructural changes in Leydig cells of streptozotocin-induced diabetic rats. **The Anatomical Record**, v. 195, n. 3, p. 415–430, 1979.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

OZDEMIR, O.; PEKER AKALIN, P.; BASPINAR, N. Pathological Changes in the Acute Phase of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 53, n. 5, p. 783–790, 2009.

PAASCH, U. et al. Identification of Increased Amounts of Eppin Protein Complex Components in Sperm Cells of Diabetic and Obese Individuals by Difference Gel Electrophoresis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 8, p. M110.007187, 2011.

PAN, W. et al. Metabolic consequences of ENPP1 overexpression in adipose tissue. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 5, p. E901–E911, 2011.

PAPA, F. O. et al. FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES RECUPERADOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE GARANHÕES SUBFÉRTEIS. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 255–263, 2011.

PEDERSEN, S. D. Metabolic complications of obesity. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 179–193, 2013.

PERALES, M.-A.; SENER, A.; MALAISSE, W. J. Hexose metabolism in pancreatic islets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 261, n. 1, p. 16–26, 1988.

PETROIANU, A. et al. Relação entre diabetes mellitus e fertilidade masculina. **Einstein**, v. 7, n. 31, p. 407–410, 2009.

PICKUP, J.; FRCPATH, D. Inflammation and Activated Innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **diabetes care**, v. 27, n. 3, p. 813–823, 2004.

PILATZ, A. et al. Metabolic syndrome and the seminal cytokine network in morbidly obese males. **Andrology**, v. 5, n. 1, p. 23–30, 2017.

PONTES, D. A. et al. Ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: The role of testosterone. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 1, p. 130–138, 2011.

POZZA, C.; ISIDORI, A. M. What's Behind the Obesity Epidemic. **Imaging in Bariatric Surgery**, v. 88, n. 10, p. 1–8, 2018.

PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Are the Beta-Cell Signaling Molecules Malonyl-CoA and Tissue Defects of Obesity and NIDDM? Cytosolic Long-Chain Acyl-CoA Implicated in Multip. **Diabetes**, v. 45, n. 3, p. 273–283, 1996.

RAHMANIFAR, F.; TABANDEH, M. R. Adiponectin and its receptors gene expression in the reproductive tract of ram. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1–3, p. 263–267, 2012.

RAK, A. et al. Adiponectin and resistin: Potential metabolic signals affecting hypothalamo-pituitary gonadal axis in females and males of different species. **Reproduction**, v. 153, n. 6, p. R215–R226, 2017.

RATO, L. et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 6, p. 330–338, 2012.

RATO, L. et al. Testosterone deficiency induced by progressive stages of diabetes mellitus impairs glucose metabolism and favors glycogenesis in mature rat Sertoli cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 66, p. 1–10, 2015.

RIBEIRO, C. **Exercício Na Prevenção Do Diabetes Mellitus Em Modelo Experimental com ratos**. p. 55, 2008.

RIERA, M. et al. Regulation of lactate production and glucose transport as well as of glucose transporter 1 and lactate dehydrogenase A mRNA levels by basic fibroblast growth factor in rat Sertoli cells. **Journal of Endocrinology**, v. 173, n. 2, p. 335–343, 2002.

RITCHIE, H.; ROSER, M. (2018) - "Obesity". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/obesity>' [Online Resource].

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68S, n. suppl., p. s138–s146, 2007.

RODRIGUEZ-RIGAU, L. Diabetes and Male reproductive function. **Journal of Andrology**, v. 1, n. 3, p. 105–110, 1980.

ROGLIC, G. et al. The Burden of Mortality Attributable to Diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 9, p. 6, 2005.

ROSE, D. P.; KOMNINO, D.; STEPHENSON, G. D. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. **Obesity Reviews**, v. 5, n. 3, p. 153–165, 2004.

SAHU, A. Leptin signaling in the hypothalamus: Emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 24, n. 4, p. 225–253, 2003.

SANTOS, J. H. **Dieta De Cafeteria E Seu Impacto Em Parâmetros Bioquímicos Preditivos Da Síndrome Metabólica Em Modelo Experimental**. 2016. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SARAHEIMO, M. et al. Serum adiponectin and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, n. 6, p. 1165–1169 5p, 2008.

SCHERER, P. E. et al. a Novel Serum-Protein Similar To C1Q, Produced Exclusively in Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746–26749, 1995.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: From lipid storage compartment to endocrine organ.

Diabetes, v. 55, n. 6, p. 1537–1545, 2006.

SETHI, J.; HOTAMISLIGIL, G. The role of TNF-alpha in adipocyte metabolism. **CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY**, v. 10, n. 1, p. 19–29, 1999.

SILVA, R. F. **Efeitos da estimulação ultrasônica sobre a espermatogênese de ratos pré-púberes e adultos. Estudo experimental**. 2007. Dissertação (Mestrado)-Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SINDELAR, D. K. et al. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. **Diabetes**, v. 48, n. 6, p. 1275–1280, 2000.

SINGLA, P.; BARDOLOI, A.; PARKASH, A. Metabolic effects of obesity: A review. **World Journal of Diabetes**, v. 1, n. 3, p. 76–88, 2010.

SMITH, J. T. et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3686–3692, 2005.

SOUZA, F. F. et al. Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 283–286, 2009.

SPERETTA, G. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C.D. O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, p. 61–69, 2014.

SPICER, L. J. Leptin: A possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, n. 4, p. 251–270, 2001.

STRACZKOWSKI, M. et al. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4602–4606, 2002.

TAVRIDOU, A. et al. Association of plasma adiponectin and oxidized low-density lipoprotein with carotid intima-media thickness in diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

TRAYHURN, P. Adipocyte Biology. **Obesity Reviews**, v. 8, n. suppl. 1, p. 41–44, 2007.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 03, p. 329–339, 2001.

TROPF, M. et al. Cardiac and Metabolic Variables in Obese Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1000–1007, 2017.

TUMURBAATAR, B. et al. Adipose Tissue Insulin Resistance in Gestational Diabetes. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 15, n. 2, p. 86–92, 2017.

VAN TILBURG, M. et al. Influência da insulina na congelabilidade do sêmen de ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 731–739, 2008.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue : **Endocrine**, v. 21, n. 6, p. 697–738, 2000.

WEISBERG, S. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation , stress , and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2005.

WOLF, A. M. et al. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, n. 2, p. 630–635, 2004.

WOZNIAK, S. E. et al. Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, n. 9, p. 1847–1856, 2009.

WU, L. et al. Adiponectin protects Leydig cells against proinflammatory cytokines by suppressing the nuclear factor- κ B signaling pathway. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 16, p. 3920–3927, 2013.

XITA, N.; TSATSOULIS, A. Adiponectin in Diabetes Mellitus. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 32, p. 5451–5458, 2012.

XIU-YAN, Y. et al. Proteomics Analysis of Testis of Rats Fed a High-Fat Diet. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 378–389, 2018.

YAMAUCHI, T. et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, p. 762–769, 2003.

YAN, S. F. et al. Tempering the wrath of RAGE: An emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. **Annals of Medicine**, v. 41, n. 6, p. 408–422, 2009.

YUDKIN, J. S. et al. C-reactive protein in healthy subjects: Associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: A potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 4, p. 972–978, 1999.

ZHANG, Y. et al. positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425–432, 1994.

ZOZULINSKA, D. et al. Serum interleukin-8 level is increased in diabetic patients. **Diabetologia**, v. 42, n. 1, p. 117–118, 1999.

HIPÓTESE

Com esse estudo, espera-se responder a hipótese que a obesidade e diabetes são capazes de alterar a capacidade reprodutiva no macho diminuindo a qualidade do sêmen à nível proteico ou levar a infertilidade.

OBJETIVO GERAL

A obesidade tem alto índice mundial e acarreta diversas outras doenças, por exemplo, o diabetes, e vêm sendo levantada como uma das causas de infertilidade em diferentes espécies e em humanos. Pretende-se identificar diferenças na capacidade reprodutiva e no perfil proteômico de ratos obesos e diabéticos e seus impactos sobre a capacidade reprodutiva de macho.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1

Artigo redigido de acordo com as normas da revista Fertility and Sterility

<https://www.fertstert.org/content/authorinfo>

Implications of obesity and diabetes on proteomic of sperm cell

Marcos G. Carvalho, BIO, Kelry M. Silva, M.V., M.Sc., Viviana-Helena V. Aristzabal, M.V., M.Sc., Ph.D., Pablo-Eduardo O. Ortiz, M.V., M.Sc., Cristiane S. Paranzini, M.V., M.Sc., Fabiana F. Souza, M.V., MSc., Ph.D.

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Correspondence: Dr. Fabiana F. Souza, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Rua Prof. Dr. Walter Maurício Correa, s/n, Rubião Junior, Botucatu, SP 18681-681, Brazil. Tel: +55 14 3880-2237. E-mail: fabiana.f.souza@unesp.br

Abstract

Objective: Estudar os efeitos da doença sobre o perfil proteico e parâmetros espermáticos de de ratos obesos ou diabéticos. Ambos os grupos apresentaram alterações na citologia testicular, apresentando redução

Design: Foi induzido obesidade e diabetes em ratos Wistar com n amostral/grupo (10).

Result(s): Houve aumento e diminuição do peso corporal nos grupos obesos e diabéticos respectivamente. Os animais diabéticos apresentam aumento significativo no índice glicêmico. Quanto às alterações sistêmicas houve aumento da leptina no grupo obeso e redução da adiponectina nos diabéticos. Na citologia testicular houve aumento na concentração de das linhagens finais da espermatogênese e, aumento das células de Sertoli, e na morfologia houve redução de células normais nos grupos diabéticos e obesos, quando comparados ao controle. Na análise proteômica, foram identificadas 15 proteínas como importantes na separação dos grupos, 14 encontravam-se menos expressas no grupo diabético e 7 obeso. Apenas 1 proteína foi mais expressa no grupo diabético e 8 no obeso. A maioria dessas proteínas foram relacionadas com a produção de ATP e função estrutural.

Conclusion(s): Há poucos trabalhos com proteômica de espermatozoide frente a obesidade e diabetes. Foram relatadas proteínas não identificadas em estudos anteriores. Assim, essas descobertas podem tornar-se marcadores úteis da fertilidade.

Key Words: Metabolismo, fisiologia reprodutiva, citocina, proteômica

INTRODUÇÃO

Em humanos, atualmente estima-se que a infertilidade atinja 10% a 20% dos casais em idade reprodutiva, e em aproximadamente 30% dos casos, a infertilidade é causada apenas por fatores masculinos (produção baixa ou inadequada de espermatozoide, hábitos de vida e doenças). Portanto, a avaliação e o tratamento assumem uma importância crucial, para doenças associadas com a infertilidade como a obesidade e diabetes, as quais podem ser concomitantes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010) estima que aproximadamente 80 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentam obesidade (1).

O diabetes é uma doença com elevada incidência e de abrangência mundial, cuja prevalência é de 5,83%, em pessoas com idades entre 20 e 79, dentro dessa faixa etária, homens que estão no auge da fase reprodutiva são acometidos (2–4)

As alterações como, resistência ou baixa produção de insulina, hiperglicemia, mudanças nos níveis, leptina, adiponectina e citocinas pró-inflamatórias, afetam a espermatogênese (5), reduzindo o potencial reprodutivo (6), desenvolvimento do hipogonadismo (7–9), aumento do estresse oxidativo (10), declínio da testosterona (11), podendo levar a infertilidade (12,13).

Em vista da importância da obesidade, do diabetes e os danos causados por alterações sistêmicas, sobre a fertilidade masculina, este estudo tem como objetivo identificá-las avaliando suas consequências sobre a capacidade reprodutiva de ratos obesos ou diabéticos. Utilizando a espectrometria de massas como ferramenta para obter o perfil proteico global, avaliando descobertas que possam servir como potenciais alvos terapêuticos de intervenção ou biomarcadores para diagnósticos ou prognóstico da infertilidade masculina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O projeto foi realizado de acordo com os preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Instituição (nº 0142/2017).

Animais e dieta

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar com 55 dias de

idade (~ 1 ano em humano) (14), pesando cerca de 130 g, alojados em caixas (41 x 34 x 16 cm), com densidade populacional de 2 animais/caixa, em ambiente climatizado a 22° C. Os ratos foram separados em 3 grupos, sendo controle (n = 10), obesos (n = 10) e diabéticos (n = 10). Para os grupos controle e diabéticos foi oferecida ração comercial 25 g/animal/dia, totalizando 50 g por gaiola e água *ad libitum*. Para o grupo obeso foi oferecida a dieta de cafeteria (15) e água *ad libitum* contendo 5% de sacarose.

A dieta foi constituída de 100 g de ração comercial triturada em um moinho utilizando peneira nº 3 para formação de grânulos finos, acrescida de 100 mL de leite condensado, 21,2 g de açúcar refinado e 80 mL de água filtrada. A mistura foi homogeneizada manualmente até obtenção de uma massa firme. Em seguida, a massa foi depositada em formas de silicone com formato cilíndrico e assada em forno por 40 minutos a 180° C. (REFERÊNCIA).

Delineamento experimental

Os animais foram adquiridos do Biotério da Instituição aos 36 dias de idade, separados nos grupos experimentais e mantidos por 18 dias para adaptação. Após o período de adaptação, os ratos foram pesados (peso inicial), procedimento repetido uma vez/semana até o final do estudo. Os resultados da variação do ganho de peso foram expressos em gramas (g).

O tempo total de estudo foi 285 dias, sendo 19 de período de adaptação e 266 dias de tratamento.

O grupo controle e diabético receberam dieta controlada e água *ad libitum* durante todo o período experimental. O grupo diabético no 213º dia, após jejum de 12 horas, os ratos foram pesados e receberam 35 mg/kg de estreptozotocina (Sigma-Saint Louis, Missouri, USA) (REFERÊNCIA) diluída em 1 mL de solução de 0,01 M de citrato de sódio pH 4,5 filtrado (filtro 0,22 µm), por via intraperitoneal em aplicação única (REFERÊNCIA). Os ratos foram considerados diabéticos quando apresentaram perda de peso corporal e níveis de glicemia maiores ou iguais a próximo a 120 mg/dL, determinados com glicosímetro digital. O grupo controle e obesos receberam uma aplicação única de 1 mL da solução de diluição do indutor do diabetes, pela mesma via (16) e também foram pesados anterior ao procedimento.

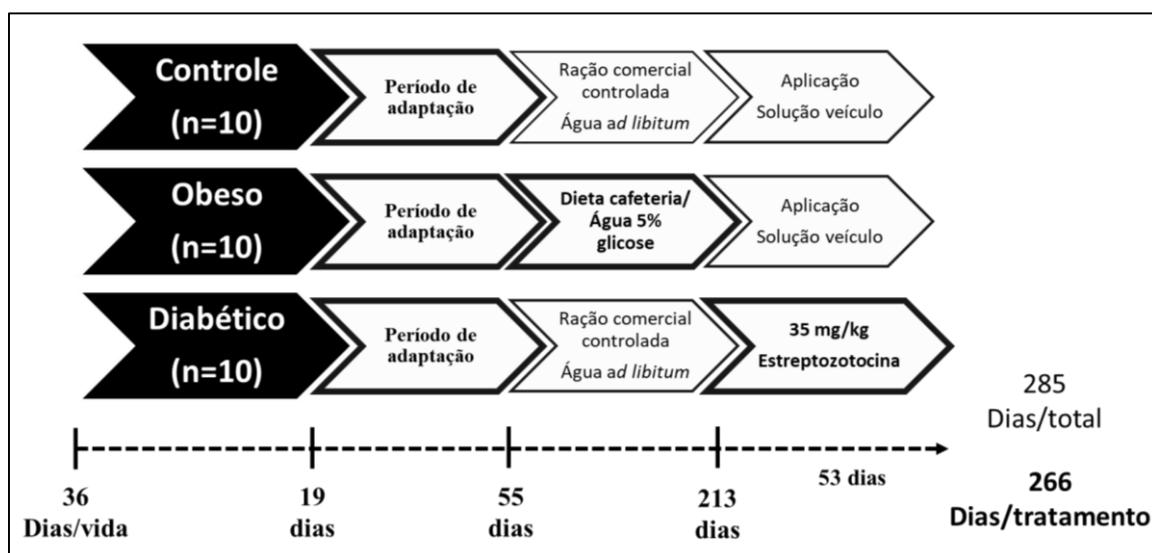


Figura 1 Gráfico temporal do delineamento experimental ilustrando os momentos de tratamento para cada grupo.

Aos 285 dias (no grupo diabéticos, 53 dias após a aplicação do produto, respeitando o ciclo da espermatogênese no rato) (17), (~ 25 anos em humano) (14), todos os ratos foram eutanasiados, após a sedação com cetamina (87,5 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg), com posterior indução da parada cardio-respiratória com tiopental, intraperitoneal, como sugerido pelo CONCEA (2013). Após a sedação, o sangue de cada animal foi colhido por punção cardíaca, centrifugado por 10 minutos a 1.000 g a 4° C, para obtenção do soro. O soro foi armazenado a -80° C até análise das concentrações de testosterona, adiponectina, leptina e IL-8. A seguir, foi medido o comprimento naso-anal e aferido o peso corporal final para o cálculo do índice de Lee. Para isso, foi subtraído o peso final pelo peso inicial e colocados na fórmula: raiz cúbica do peso corporal expressos em gramas dividido pelo comprimento naso-anal em centímetro, sendo multiplicados por mil (18). Em ratos, esse parâmetro equivale à massa corporal para humanos (19). Após a eutanásia, a laparotomia foi executada e a gordura retroperitoneal e gonadal foram individualizadas e dissecadas, para avaliação da porcentagem de gordura corporal (20). Os testículos/epidídimos foram colhidos para extração dos espermatozoides epididimários e histologia.

Citologia testicular

Os testículos esquerdos foram seccionados no sentido transversal utilizando uma navalha descartável para micrótomo. A seguir, as porções com o parênquima testicular

exposto foram pressionadas em uma lâmina de vidro (*imprint*). As lâminas foram secas ao ar e coradas pelo método panótico rápido. Então foram avaliadas em microscopia óptica, em um aumento de 1,000X. Foram contados os tipos celulares espermatogônias, espermátocitos primários e secundários, espermátides, espermatozoides, até atingirem o total de 200 células de. Com exceção das células de Sertoli e Leydig, que foram contadas separadamente (21).

Morfometria dos túbulos seminíferos

Porções do testículo esquerdo, previamente utilizadas, foram armazenadas em cassetes em formalina 10% tamponada por 48 horas e, posteriormente, transferidos para o álcool 70%. Então foram submetidas a processamento histológico de rotina e coradas com hematoxilina e eosina.

As avaliações morfométricas foram realizadas utilizando-se o software ImagePro® (Discovery, Media Cybernetics, 2005) e microscopia óptica (Olympus BX50, 1993). Em cada amostra foram fotografados 10 campos em aumento de 100X, avaliando os túbulos seminíferos. As observações realizadas consistiram na quantificação do número de túbulos seminíferos/área pré-estabelecida, o diâmetro dos túbulos seminíferos, a espessura do epitélio germinativo.

Extração e avaliação dos espermatozoides epididimários

O epidídimo direito foi separado do testículo e os espermatozoides foram colhidos por perurações da cauda com agulha hipodérmica de 18G. Os túbulos foram expostos permitindo o extravasamento dos espermatozoides (22) e permaneceram imersos em 2 mL do meio BWW. O meio BWW foi preparado de acordo com Whitten e Whittingham (1971) com modificações, porém com osmolaridade de 290 mmol/kg com adição de NaCl. A amostra foi mantida em placas de Petri (40 x 10 mm) descartáveis esterilizadas sobre uma mesa aquecedora (37° C). A concentração espermática foi determinada em câmara hematómetrérica de Neubauer após a diluição de 1: 20 em formol-salina tamponada. Os espermatozoides foram contados sob microscópio de contraste de fase, num aumento de 400x e o número de células foram expressos em milhões/mL. A morfologia espermática foi conduzida usando o método de câmara úmida, utilizando as amostras diluídas em formol-salina para a determinação da concentração espermática.

A amostra restante foi encaminhada para análise da peroxidação lipídica em citometria de fluxo. Uma alíquota foi diluída em meio de Tyrode na concentração de 5 x

10⁶ espermatozoides/mL, avaliando a peroxidação lipídica dos espermatozoides. Para isso em duas alíquotas de 499,5 µL de amostra foram adicionados 0,5 µL C11-BODIPY^{581/591} (1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, EUA) a 37° C por 30 minutos. Então as amostras foram centrifugadas a 300g por 10 minutos, o controle negativo foi ressuspendido em 1 mL de meio Tyrode, o controle positivo em 80 µM de sulfato ferroso (Fe₂SO₄) e 5 µM hidroperóxido de cumeno (CuOOH) (Sigma Chemical Co., São Paulo, Brasil) por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Então, 1 µL Hoechst 33342 (100 µg/mL, H-1399, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, EUA) foi adicionado e reincubado a 37° C por 5 minutos. Um total de 10.000 eventos/amostra foi analisado pela citometria de fluxo (BD LSRFortessa™, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), equipado com 3 lasers de excitação (violeta: 405 nm 50 mw; azul: 488 nm 50 mw; vermelho: 640 nm 40 mw Inc.). A fluorescência verde (FL1) foi colhida pelo filtro 580 nm marcando peroxidação e a fluorescência vermelha (FL3) por filtro de 635 nm marcando não peroxidação. Assim foi medida a interação entre os ácidos graxos ligados ou não a radicais peroxila, para avaliação da integridade de membrana (23).

Preparação das proteínas espermáticas

Após a colheita das células espermáticas da cauda do epidídimo direito, as amostras foram preparadas para proteômica. Os espermatozoides foram lavados 3x em PBS pH 7,0 contendo inibidor de proteases (0,8 mmol EDTA, 1,0 µg/mL aprotinina, 1,0 µg/mL leupeptina e 35,0 µg/mL PMSF [*phenylmethylsulfonyl fluoride*] em 50 mmol TRIS-HCl pH 7,2), por centrifugação, durante 10 minutos, a 800 g. O pellet final foi diluído em tampão RIPA modificado (PEACH, et al., 2012), contendo inibidores de proteases (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 50 mM TRIS-HCl pH 7,5, 0,8 mmol EDTA, 1,0 µg/mL aprotinina, 1,0 µg/mL leupeptina e 35,0 µg/mL PMSF em 50 mmol TRIS-HCl pH 7,2).

As amostras foram sonicadas em banho de gelo (24), centrifugadas a 10.000 x g, durante 30 minutos. Então, para a concentração de proteínas foi usada a precipitação em acetona. O sobrenadante foi diluído em 1: 5 (amostra: acetona). A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso por 1 hora a -20° C, agitando-se a cada 10 minutos. O sobrenadante foi retirado por centrifugação (5.000 g por 20 minutos) e a etapa repetida. Ao final a amostra foi centrifugada novamente e o sobrenadante retirado. O tubo permaneceu aberto por 15 minutos em uma capela para evaporação dos resíduos de

acetona. O pellet foi eluído em 40 µL de 50 mM TRIS-HCl pH 7,2. A homogeneização foi realizada e a amostra foi conservada a -20° C.

A concentração de proteína total do extrato de espermatozoides da cauda do epidídimo foi determinada em A280.

Um total de 50 µg de proteína foi preparado para eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Após a entrada das amostras no gel de separação, a corrida foi interrompida e o gel corado com comassie R-250. Os fragmentos corados foram recortados e a digestão conduzida.

A digestão peptídica foi realizada segundo Shevchenko et al., 1996, com modificações. A descoloração foi realizada com metanol 50% + ácido acético 2,5% em água purificada, por 4 vezes. Os fragmentos foram desidratados com acetonitrila 100%. A redução foi realizada com DTT (Bio-Rad® Lagoa Santa, SP, BR) e a alquilação com iodoacetamida (Bio-Rad® Santo Amaro, MG, BR). A digestão foi conduzida com tripsina (20ng/µL) na proporção de 1:50 tripsina/substrato, *overnight*. Foi usado para digestão das bandas, deixando por 30 minutos em banho de gelo. A extração foi realizada com ácido fórmico 5%. A seguir, as amostras foram concentradas em SpeedVac Concentrator (SAVANT SPD1010) e armazenadas a -20° C até análise por espectrometria de massas.

Espectrometria de massas ESI-qTOF

Para espectrometria de massas, as amostras foram descongeladas, diluídas em ácido fórmico 0,1 % na proporção de 0,7 µg de proteína/µL, homogeneizadas em agitador de tubos e centrifugadas a 1.100 g por 5 minutos. A seguir, 15 µL do sobrenadante foram depositados em tubos específicos para análise no espectrômetro de massas (*Clear glass 12 x 32 mm screw neck total recovery vial* com tampa, Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Para análise de proteínas por espectrometria de massas, uma alíquota de 4,5 µL, resultante da digestão dos peptídeos foi separada por uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) RP-nano UPLC (Waters® nanoACQUITY UPLC®, Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplada ao espectrômetro de massas Q-Tof (Micromass® Q-Tof PREMIER™ Mass Spectrometer, Waters Corporation, Milford, MA, USA) com fonte de *nanoelectrospray*, com uma taxa de fluxo de 0,600 µL/minuto. Gradiente de 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico foi mantido, durante 45 minutos. A voltagem do

nanoelectrospray foi mantida em 3,5 kV, uma voltagem cone de 30 V e temperatura da fonte de 100 μ C. O instrumento foi operado em modo *top three*, no qual um espectro de massa (MS) é adquirido seguido por MS/MS dos três picos mais intensos detectados. Após a fragmentação MS/MS, o íon foi mantido na lista de exclusão por 60 segundos e para a análise de peptídeos de clivagem endógena, um tempo de exclusão real foi usado.

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

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

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

Bioinformática e ontologia gênica

O Software Mascot (Matrix Science, Londres, UK) foi utilizado para a busca dos íons MS/MS, com a taxonomia da ordem *Rattus norvegicus* do banco de dados NCBI. Os resultados do Mascot serão submetidos ao programa Protein Pilot Software 4.0 (AB Sciex, Framingham, USA) para realizar as análises dos conjuntos de dados, de forma a validar os peptídeos base MS/MS e identificação de proteínas. Após identificação proteica com o Protein Pilot Software, os dados serão inseridos no banco de dados UniprotKB (www.uniprot.org.br) e Phanter (www.pantherdb.org), para obter a anotação da ontologia gênica (GO) usando as categorias função molecular, processo biológico, componente celular.

Análise estatística

Para a normalização dos dados foram excluídos os grupos proteínas que não foram encontradas em pelo menos metade dos animais de cada grupo. A somatória da abundância proteica (emPAI) de cada animal e o seu valor foi dividido pela contagem total de proteínas e o resultado final foi usado para a análise estatística.

Os grupos foram submetidos à análise de agrupamento não hierárquico no software MetaboAnalyst 3.0 (25) para confirmar a divisão dos grupos, baseado na proteômica.

A análise multivariada dos dados proteicos foi realizada pelo mesmo software, sendo utilizada a análise dos componentes principais (PCA) para descrever as variações amostrais entre grupos na matriz de pontuação e análise parcial dos quadrados mínimos (PLS-DA) indicando a relevância proteica na caracterização dos grupos. O PLS-DA foi utilizado para atribuir amostras de acordo com as classes, indicando a importância de uma classificação e cálculo das variáveis no escore de projeção (pontuação VIP). As proteínas importantes foram consideradas como pontuação VIP foi $\alpha \geq 1$ (26). A função molecular e o processo biológico de cada proteína caracterizada foram discutidos, relacionando-os as alterações encontradas e comparando os resultados com o grupo controle.

As demais variáveis foram avaliadas pelos testes de Batlett e Kolmogorov-Smirnov para identificar homogeneidade e normalidade. Variáveis não-paramétricos foram normalizados e analisados pelo ANOVA *one way* e para as comparações múltiplas pelo teste Newman-Keuls. Todos os resultados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão (SEM) na escala original. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaPlot 11.0.

RESULTADOS

Indução da obesidade

A obesidade foi induzida no grupo obeso, conforme os resultados do peso corporal, gordura retro-peritoneal, gordura gonadal e índice Lee. Contrariamente, os animais do grupo diabético apresentaram redução da gordura testicular e índice Lee (Figura 2).

Indução do diabetes

Os animais do grupo diabético apresentaram elevados níveis de glicose sérica ao

final do estudo, ao contrário dos grupos controle e obesos, nos quais não foram observadas alterações na glicemia (Figura 3). Apenas 6 ratos foram considerados no grupo diabético, já que a glicemia dos excluídos foi abaixo de 120 mg/dL.

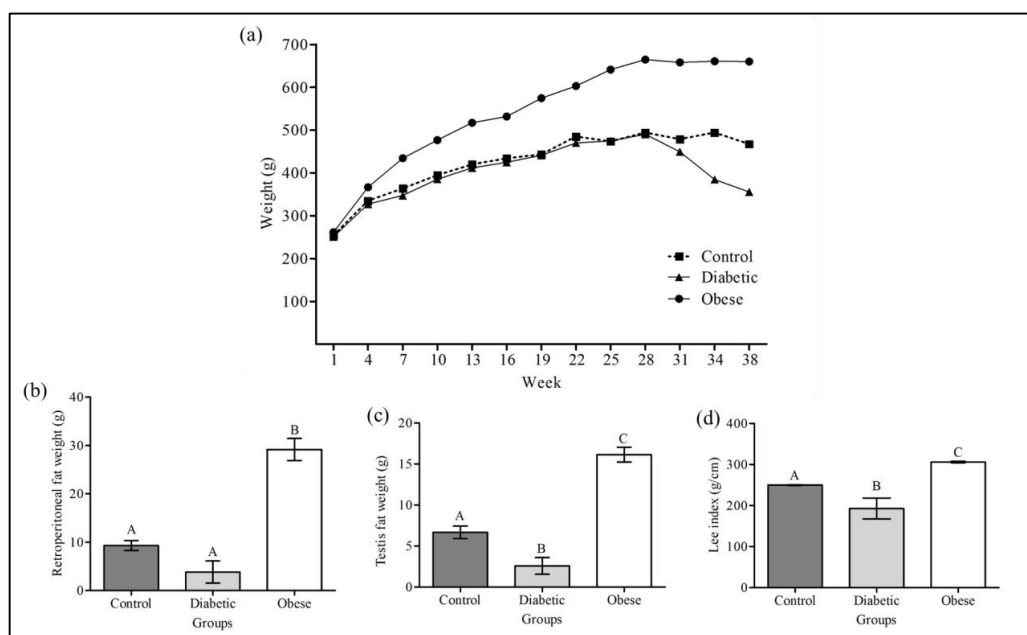


Figura 2. Resultados referentes à avaliação do tecido adiposo de ratos dos grupos controle, diabético e obeso. Peso corporal (a), quantidade de gordura retro-peritoneal (a), gonadal (b) e índice de Lee (c). ^{ABC} $P \leq 0,05$.

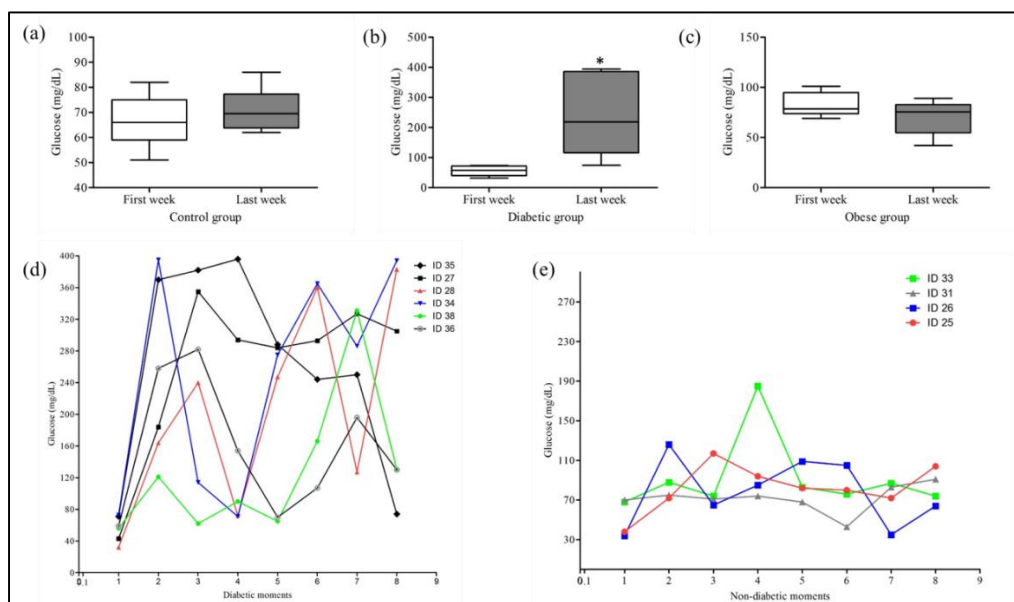


Figura 2. Variação da glicemia nos grupos controle, diabético e obeso. Média da glicemia na primeira e última semana do período experimental nos grupos controle (a), diabético (b) e obeso (c). Variação semanal da glicemia do grupo diabético nos ratos com glicemia elevada (d) e normoglicêmicos (e). Símbolo (*) indica diferença estatística ($P \leq 0,05$).

Alterações sistêmicas

A leptina sérica foi superior no grupo obeso e a adiponectina reduzida no diabético. Já a IL-8 e a testosterona sérica foram similares nos grupos (Figura 3).

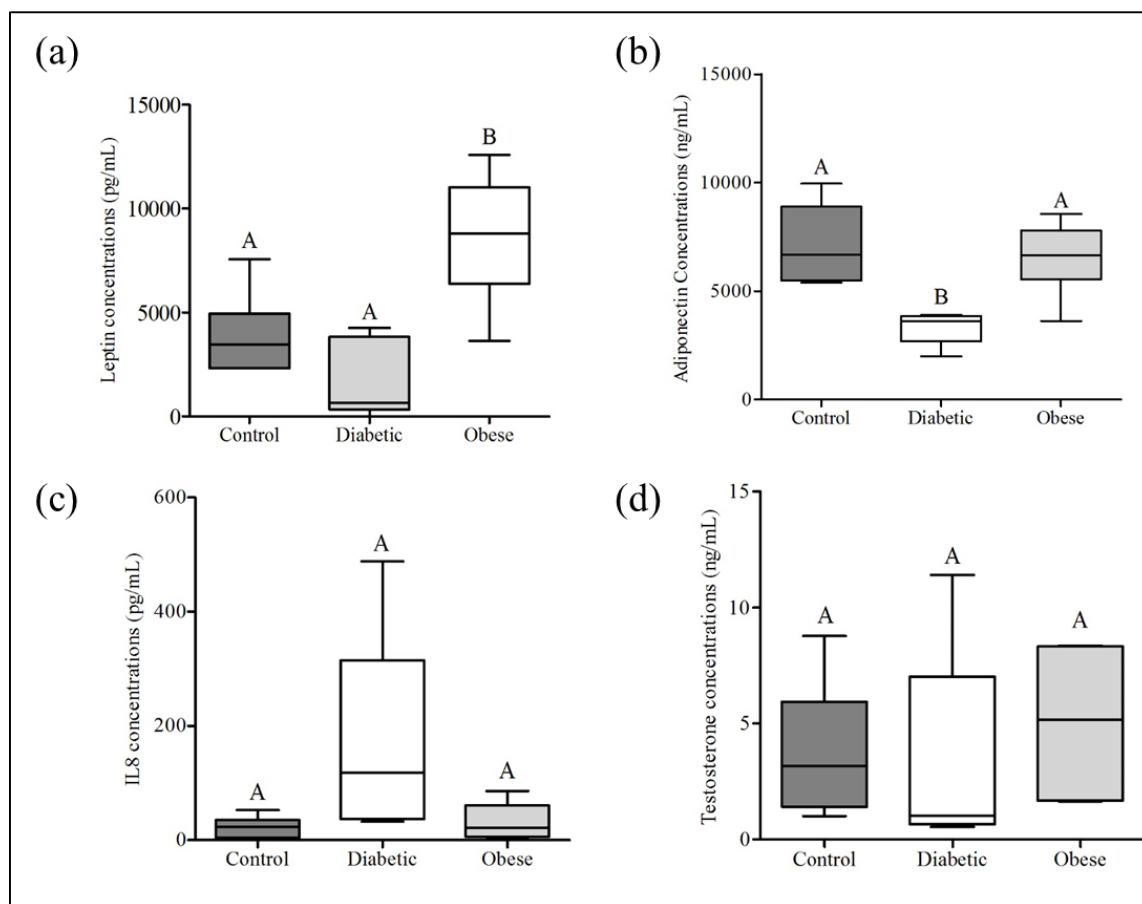


Figura 4. Concentrações séricas de leptina, adiponectina, IL-8 e testosterona nos grupos controle, obeso e diabético. ^{ABC} $P \leq 0,05$.

Citologia testicular

Na citologia testicular, no grupo diabético houve maior concentração das linhagens germinativas finais da espermatogênese, exceto espermatozoides, os quais estavam reduzidos. Neste mesmo grupo houve um aumento das células de Sertoli (Tabela 1).

Morfometria dos túbulos seminíferos

A quantificação do número de túbulos seminíferos/área pré-estabelecida, o diâmetro dos túbulos seminíferos e a espessura do epitélio germinativo não variou entre os grupos estudados.

Tabela 1. Citologia testicular, nos grupos controle, diabético e obeso.

Cell structure	Groups		
	Control	Diabetic	Obese
Spermatogonia	27.8 ± 1.1 ^a	28.8 ± 4.0 ^a	26.2 ± 1.7 ^a
Primary spermatocyte	31.0 ± 1.1 ^a	36.3 ± 3.8 ^a	27.6 ± 1.5 ^a
Secondary spermatocyte	37.8 ± 1.2 ^a	46.6 ± 3.2 ^b	37.5 ± 1.8 ^a
Spermatid	40.9 ± 1.8 ^a	59.3 ± 5.1 ^b	50.8 ± 2.8 ^c
Sperm	62.5 ± 0.9 ^a	28.8 ± 5.2 ^b	57.9 ± 2.2 ^a
Sertoli cell	3.0 ± 0.3 ^a	16.5 ± 1.6 ^b	9.1 ± 0.9 ^a
Leyding cell	4.6 ± 0.5 ^a	3.1 ± 0.6 ^a	4.6 ± 0.5 ^a

^{a,b,c} Diferentes letras marcam diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$)

Análise das características espermáticas

A concentração espermática foi similar entre os grupos, sendo $44,8 \pm 5,0$, $30,7 \pm 8,0$ e $45,4 \pm 4,9$, nos grupos controle, diabético e obeso, respectivamente.

A Tabela 2 representa os resultados referentes à análise da morfologia espermática. O grupo diabético apresentou menor porcentagem de células normais e maior de defeitos.

Tabela 2. Anormalidades morfológicas do espermatozoide, nos grupos controle, diabético e obeso expresso em porcentagem.

Morphology	Groups		
	Control	Diabetic	Obese
Normal	76.6 ± 1,8 ^a	29.3 ± 6.5 ^b	60.7 ± 1.0 ^c
Head defects	10.5 ± 0.7 ^a	45.0 ± 3.3 ^b	28.0 ± 1.1 ^c
Tail defects	13.0 ± 1.2 ^a	25.7 ± 4,3 ^b	12.0 ± 0.9 ^a

^{a,b,c} Diferentes letras marcam diferenças estatísticas entre os grupos ($P \leq 0,05$)

Os resultados da peroxidação lipídica espermática avaliada pela citometria de fluxo não identificou diferenças estatísticas nos grupos estudados, sendo 71,20 %, 61,80 % e 75,39% nos grupos controle, diabético e obeso, respectivamente.

Proteômica

Com relação à proteômica analisada pelo PCA foi observada uma separação evidente do grupo obeso, de acordo com as proteínas espermáticas, contudo o grupo diabético foi semelhante ao controle (sobreposição dos grupos controle e diabético na PCA e a mesma chave no dendograma). A soma dos componentes principais (eixo X e Y) 1 e 2 não foram acima de 50% (Figura 5).

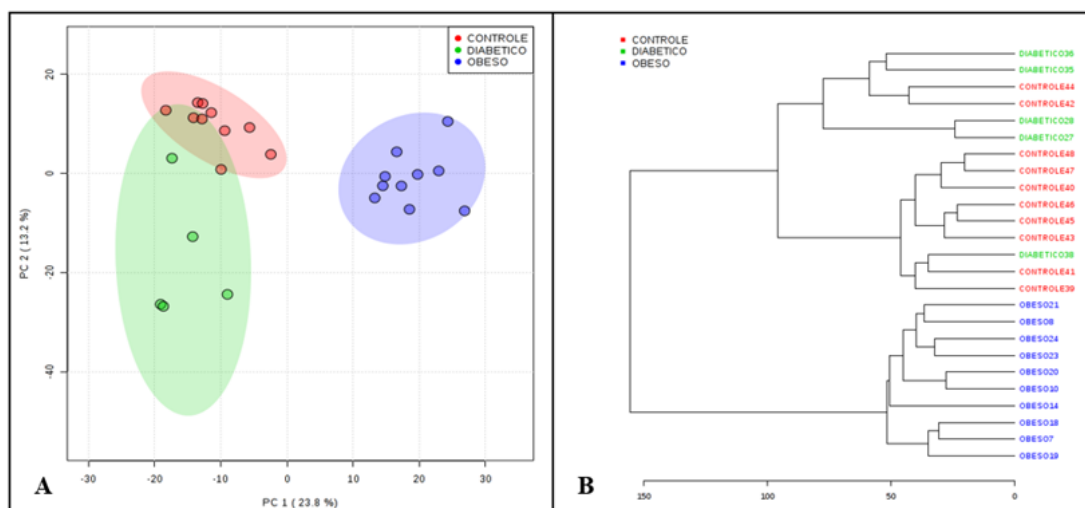


Figura 5. Análise de componente principal (a) e dendograma (b) dos emPAIs das proteínas nos grupos controle, diabético e obeso.

Na espectrometria de massas foram identificadas 144 proteínas na célula espermática nos grupos controle, diabético e obeso (Figura 6). A Tabela Suplemento 1 e 2) descreve as proteínas encontradas em cada grupo incluindo o função molecular, processo biológico e componente celular de cada proteína.

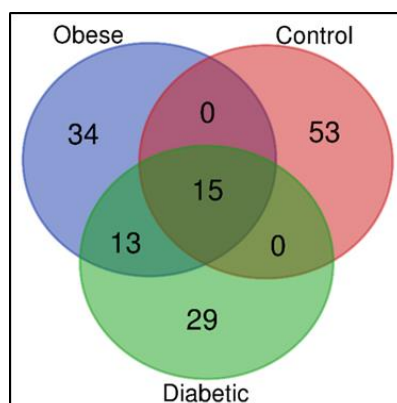


Figura 6. Diagrama de Venn das proteínas encontradas nos grupos controle, diabético e obeso.

Os principais processos identificados na ontologia gênica foram similares entre os grupos e foram mencionados em conjunto. As principais funções moleculares em todos os grupos foram atividade catalítica e de ligação; como processos biológicos, o processo celular, metabólico e localização; e em relação ao compartimento celular, as proteínas estão localizadas principalmente na região celular, organelas e complexos contendo proteínas (Figura 7).

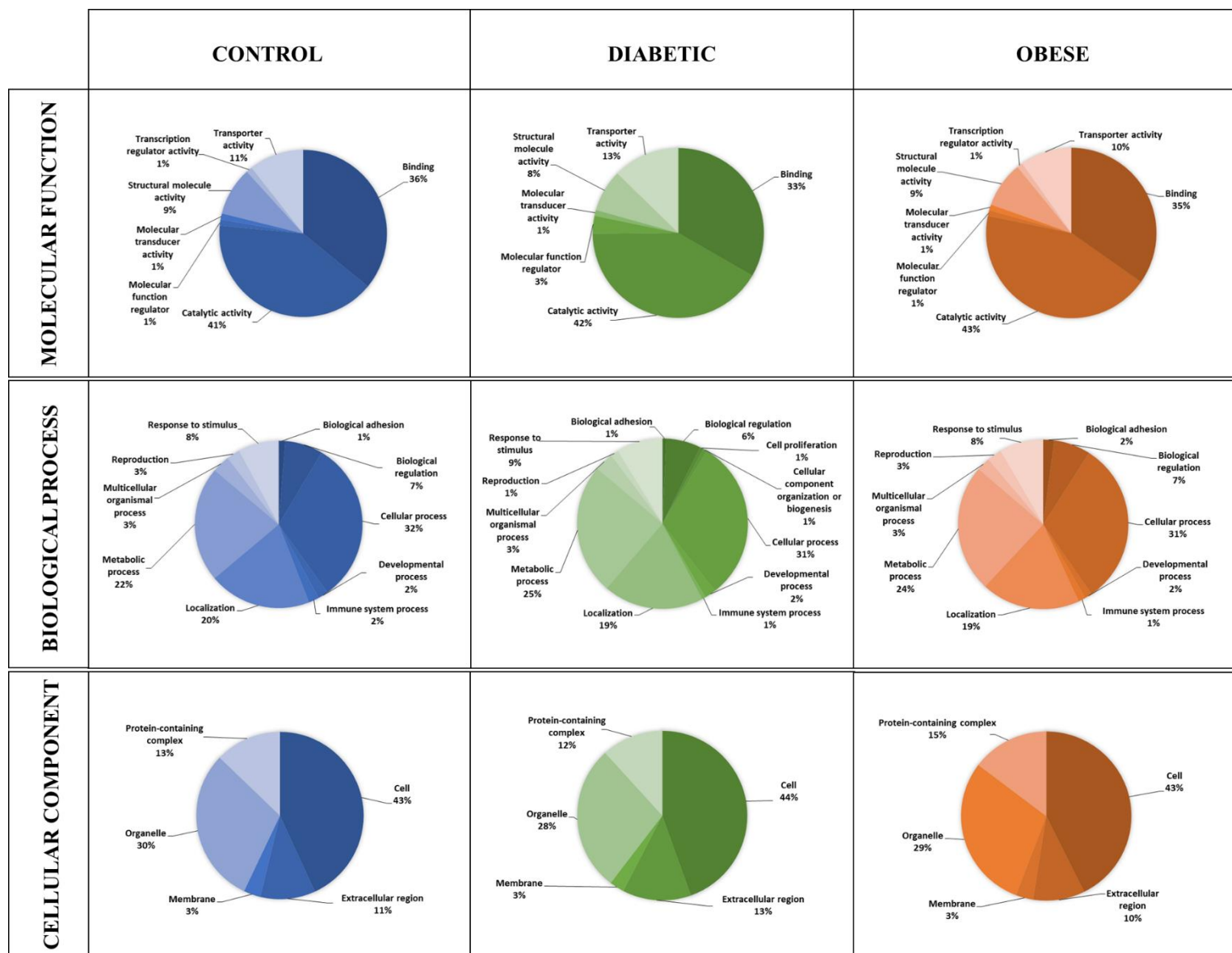


Figura 7. Ontologia gênica de cada grupo animal (controle, diabético e obeso) considerando a função molecular, o processo biológico e compartimento celular.

No *heatmap* (Figura 8) foi possível identificar os clusters de proteínas com maior ou menor expressão em cada grupo. Assim como no dendograma e PCA, o grupo obeso apresentou quando comparado aos grupos controle e diabético.

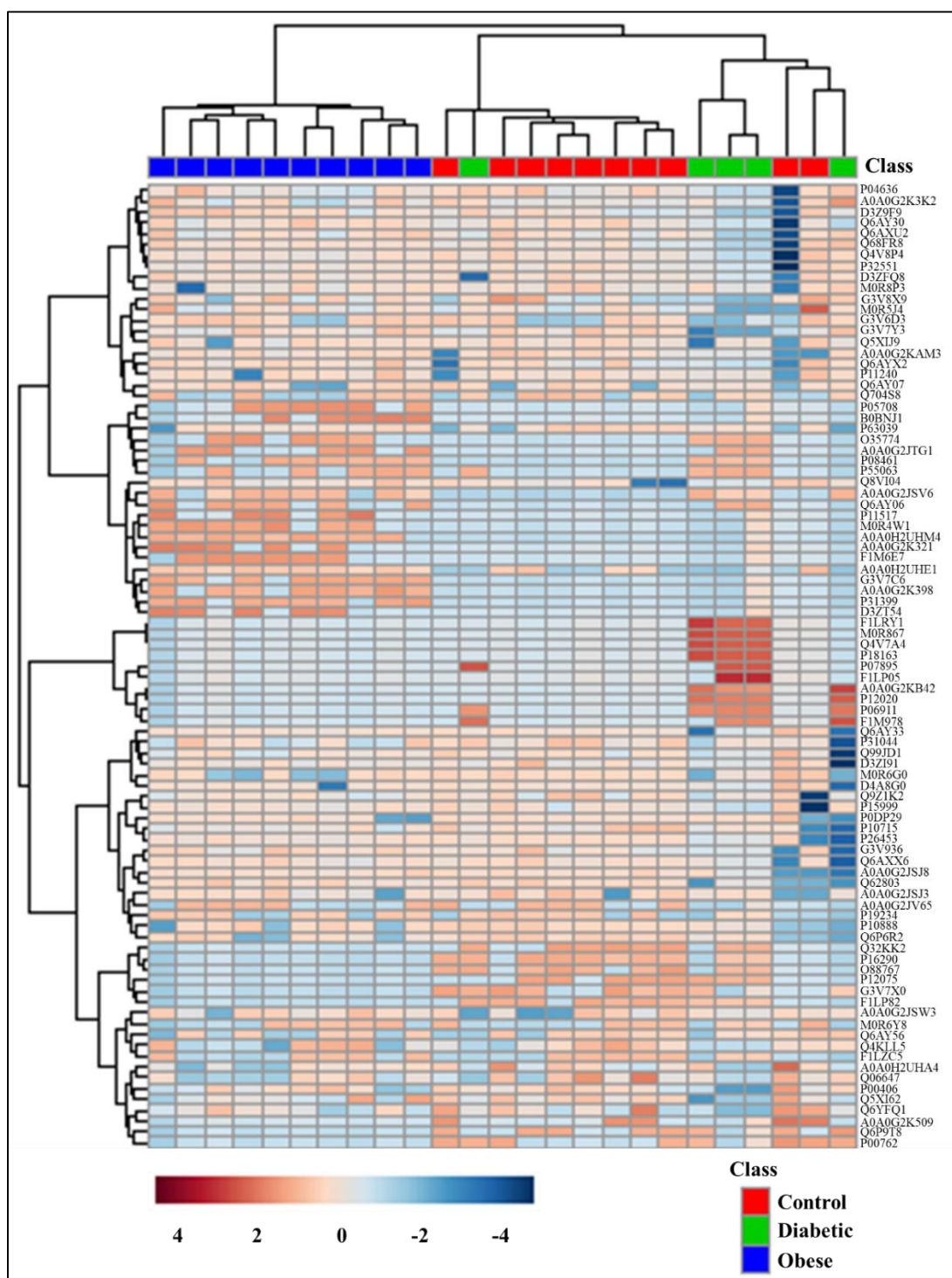


Figura 8. Análise de agrupamento não hierarquizado das amostras de acordo com a quantidade de proteína diferencialmente regulada. A cor vermelha indica quantidade aumentada e a cor azul diminuída, da quantidade de proteína em comparação com o seu valor normalizado, por animais entre os grupos controle, diabético e obeso.

Os resultados da análise de PLS-DA estão representados na Figura 9. Foram identificadas 15 proteínas com maior ou menor expressão nos grupos estudados: *outer dense fiber protein 2* (A0A0H2UHM4), *phosphoglycerate kinase* (M0R6Y8), *ATP synthase subunit beta* (G3V6D3), *tubulin beta chain* (G3V7C6), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (B1WBQ8), *ras-related protein rab-2 A* (F1LP82), *outer dense fiber of sperm tails 2, isoform CRA_e* (G3V7X0), *Protein/nucleic acid deglycase DJ-1* (O88767), *CD177 antígeno-like* (M0R4W1), *Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex mitochondrial* (P08461), *Globin c2* (A0A0G2JSV6), *tubulin beta-4B chain* (Q6P9T8), *keratin, type II cytoskeletal 5* (A0A0G2K509), *lysozyme c* (F1M6E7), e *cytochrome c, testis-specific* (P10715).

Das 15 proteínas identificadas como importantes na separação dos grupos, 14 encontravam-se menos expressas no grupo diabético e 7 obeso. Apenas 1 proteína foi mais expressa no grupo diabético e 8 no obeso. A pontuação VIP variou no intervalo de 1,7 a 2,3.

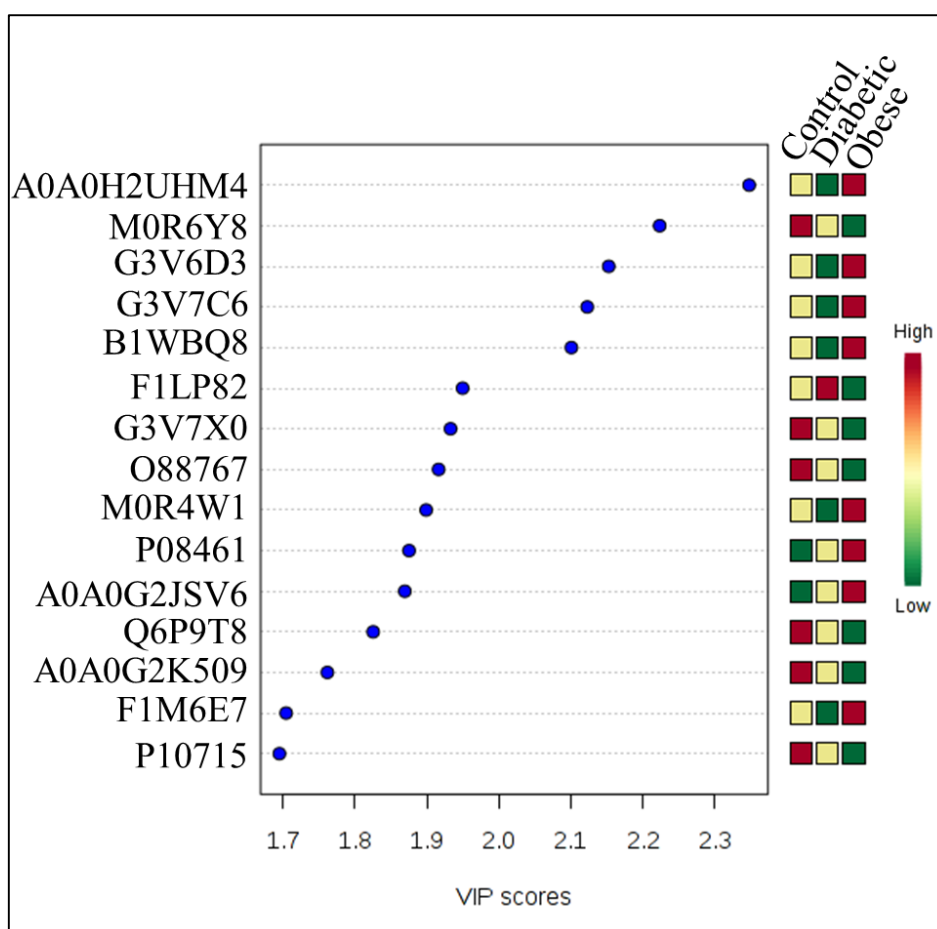


Figura 9. VIP score classificada por PLS-DA. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas correspondentes de proteínas em cada grupo.

DISCUSSÃO

Indução da obesidade

Nas primeiras 27 semanas, pode-se observar que o grupo obeso apresentou ganho de peso acentuado, quando comparado ao grupo controle, porém a partir de 28 semanas o ganho de peso foi estável. Estes resultados diferem dos encontrados em um estudo que avaliou o ganho de peso de ratos Wistar entre 1 e 5 semanas, tratados com ração hiperlipídica (27). Já o grupo diabético, quando comparado com o controle, apresentou redução do peso corporal logo após a aplicação de estreptozotocina (28), a qual foi relacionada com a baixa quantidade de glicose disponível para os tecidos, já que há uma ausência de insulina para o transporte da glicose e desta forma a energia necessária para a manutenção dos órgãos é obtida de outras fontes, como metabolismo de gordura levando assim a redução do tecido adiposo e consequente perda de peso corporal (29).

A obesidade leva ao acúmulo de gordura retroperitoneal/visceral e nas gônadas, a qual é característica específica dos indivíduos que se tornam obesos (30), sendo esse aumento progressivo responsável pelas várias alterações metabólicas, já que a gordura retroperitoneal/visceral é considerada um órgão produtor de diferentes hormônios e citocinas. A gordura retroperitoneal/visceral produz adipocinas pró-inflamatórias e fatores de ação anti-insulínica (29) os quais induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (31,32). Em homens obesos o excesso de gordura escrotal altera a espermatogênese, acarretando na diminuição da produção espermática e capacidade reprodutiva (33). Essa alteração está relacionada com a temperatura escrotal elevada (34). Essa alteração metabólica também afeta o tecido testicular de outras maneiras. A produção de insulina testicular também é afetada, prejudicando as funções dos túbulos seminíferos, já que este hormônio também é responsável pelo transporte de glicose no tecido reprodutor (35), é secretado pelas células de Sertoli (36), e também regula a capacidade de fertilização, sendo importante na via metabólica da glicose nos espermatozoides, durante sua maturação, capacitação e reação do acrossoma (37).

O maior peso corporal nos obesos e o menor nos diabéticos, avaliado pelo índice de Lee, é controverso na literatura (20,27), o que pode ser justificado pela diferença nas dietas e tempo de tratamento empregados. No presente estudo o tempo total de dieta foi de 37 semanas, o que difere da literatura mencionada, na qual os ratos foram tratados por 8 semanas (30), 12 semanas (20) e 15 semanas (38). Além disso, o índice de Lee em ratos é semelhante ao índice de massa corporal (IMC) em humanos (19), embora o IMC seja

mais sensível, já que os parâmetros considerados são diferentes (27,39).

Indução do diabetes

A dose 35 mg/kg de estreptozotocina foi eficaz para induzir o diabetes em 60% dos animais, considerando a hiperglicemia e a redução do peso como fatores representativos no desenvolvimento da doença. Ainda, notou-se que a resposta ao fármaco foi individual e, em alguns animais, a dose utilizada não foi suficiente para induzir a hiperglicemia, corroborando com os achados de Navarro-Casado et al (28). Desta forma, os animais que não apresentaram glicemia superior a 120 mg/dL, os quais são considerados diabéticos (40), foram retirados da análise. É importante mencionar que o tratamento com estreptozotocina não causa efeitos sobre as características espermáticas, sendo que as alterações na reprodução são em resposta a hiperglicemia e seus efeitos (28,41).

ALTERAÇÕES SISTÊMICAS

Leptina

A leptina é secretada pelos adipócitos e, em roedores e humanos está correlacionada com as reservas de gordura corporal (42), o que justifica o aumento das concentrações no grupo obeso. Em humanos, a leptina está altamente correlacionada com o IMC e quanto maior a espessura do tecido adiposo, maiores os níveis de leptina circulantes (43,44), o que acarreta um quadro de resistência a leptina, a perda de sua função e estimulação ineficaz da resposta à saciedade (45,46).

Neste estudo, não foi determinada redução dos níveis de leptina no grupo diabético, em relação ao grupo controle. Apesar disso, a leptina encontra-se com concentrações reduzidas em diabéticos, o que ocorre pela depleção nas reservas de tecido adiposo, já que a leptina é produzida por este tecido (3,47–49). A depleção do tecido adiposo ocorre em vista da utilização da via da lipólise para a obtenção de energia, já que a glicólise e gliconeogênese estão comprometidas pela redução das concentrações de insulina (29). Ainda, os testículos (50) e a membrana plasmática dos espermatozoides (51) possuem receptores para a leptina, atuando no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, fazendo a conexão entre a condição nutricional e a reprodução, indicando que há reservas energéticas (7–9). Nos dois grupos estudados, obeso e diabético, há redução da ação da leptina testicular, já que no diabético o efeito é direto e nos obesos ocorre uma resistência a ação da leptina. Desta maneira, os efeitos no tecido reprodutor são semelhantes, com

impacto na fertilidade (42) e na maturação espermática (52).

Adiponectina

A adiponectina, adipocina secretada pelo tecido adiposo, é uma citocina sensibilizadora de insulina e tem ação anti-inflamatória (53). Na obesidade e diabetes há alterações nos níveis desta adipocina, as quais estão relacionadas com a resistência à insulina e hiperglicemia (54,55), respectivamente. Apesar disso, no grupo obeso não encontramos níveis alterados de adiponectina, embora existam relatos da redução dos seus níveis plasmáticos relacionados com a resistência à insulina em humanos obesos (56).

Os estudos são conflitantes em relação aos níveis de adiponectina em diabéticos. No nosso estudo houve uma redução das concentrações desse hormônio no grupo diabético, resultados também já descrito em homens (57). Contudo, outros estudos encontraram níveis elevados de adiponectina em homens diabéticos (58). A diminuição dessa adipocina é relacionada com alterações advindas do diabetes, como resistência à insulina, acidose metabólica, aumento do estresse oxidativo, afetando sua expressão (59). Suas concentrações está relacionada com alterações da função testicular, levando a atrofia dos túbulos seminíferos e aspermia (60), já que atua na espermatogênese estimulando a proliferação celular e sobrevivência, diminuindo apoptose celular e estresse oxidativo. Também foi relacionada com o aumentando da concentração espermática, já que melhora o transporte de substratos energéticos como glicose e lactato para manutenção de ATP. (5,61). Em estudos com touros, foram encontradas concentrações altas de adiponectina, relacionada com animais de alta fertilidade (61).

Interleucina 8 (IL-8)

A obesidade e o diabetes têm sido relacionados com o nível de citocinas e proteínas associadas com a resposta inflamatória sistêmica (62,63). As citocinas são também relacionadas com as adipocinas como leptina e adiponectina (64,65), as quais possuem ação pró e anti-inflamatória, respectivamente (66). A síndrome metabólica que ocorre nos obesos leva ao aumento da leptina e redução da adiponectina, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, causando estados inflamatórios crônicos, mas pouco acentuados (67). Wu et al. (66) encontraram receptores 1 e 2 para adiponectina em células de Leydig de camundongos cultivadas *in vitro* e demonstraram que esta adipocina protege as células de Leydig em vista do seu estímulo para a produção de citocinas anti-

inflamatórias. Outros estudos demonstram a importância do controle das citocinas pró-inflamatórias no trato reprodutor e da relação destas moléculas com a adiponectina. Apesar disso, a concentração de IL-8, uma citocina pró-inflamatória, não foi alterada nos grupos estudados, o que concorda com os resultados de Pilatz et al. (68), os quais encontraram apenas IL-6 e IL-10 alteradas no plasma sanguíneo de indivíduos obesos. Contudo, estes últimos autores mencionam não haver níveis alterados de citocinas pró-inflamatórias no plasma seminal. No grupo diabético as concentrações de adiponectina foram menores, o que poderia justificar efeitos negativos sobre o sistema reprodutor. De fato, Esposito et al. (69) encontraram correlação das concentrações de IL-8 e o escore de disfunção erétil em homens obesos.

Testosterona

Embora a literatura mencione resultados da diminuição da testosterona em indivíduos obesos (70) e diabéticos, podendo ser crítico para manutenção da espermatogênese e qualidade espermática (7–9,71), nos animais e grupos estudados não foram encontradas alterações nas concentrações de testosterona em relação ao controle. Apesar disso, estudos demonstram a relação entre os níveis altos de leptina e baixos de testosterona Isidori et al. (50), já que esta adipocina já foi demonstrada com efeito inibitório da produção deste esteroide nas células de Leydig de roedores (72), porém em outros achados os níveis plasmáticos de testosterona não foram afetados (60). Ademais, os homens estudados apresentaram baixas concentrações de testosterona (73). Estas alterações também podem estar relacionadas com a produção de estrógenos pelo tecido adiposo em humanos obesos (74), contribuindo para redução das concentrações de testosterona, já que estes hormônios estão interligados (73).

Peroxidação lipídica

A obesidade, diabetes e os efeitos causados pela síndrome metabólica, estão associadas ao aumento do estresse oxidativo (75) e por este motivo a produção do ânions superóxido foi avaliada nas células espermáticas no nosso estudo. A produção de fatores anti-insulínicos em obesos e diabéticos induzem ao aumento de ácidos graxos livres na circulação. Esses ácidos graxos se depositam em alguns órgãos e levam ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). No ambiente testicular podem levar a danos na integridade da membrana plasmática e no DNA espermático (10), podendo afetar também sua funcionalidade, pois há perturbação da função mitocondrial e

consequente diminuição da produção de energia responsável pela motilidade espermática (11). Apesar disso, não foram encontradas alterações na produção do ânion superóxido nas células espermáticas, embora a elevação dos níveis de ERO já tenha sido mencionada em células espermáticas de homens obesos (76,77).

Proteômica

Para a formação dos três agrupamentos foram considerados os resultados do emPAI das proteínas espermáticas no grupo controle, obeso e diabético. Apesar disso, a classificação dos grupos de acordo com os resultados da proteômica não foi confirmada pela PCA, o qual apresentou valor inferior a 50% na somatória PC1+PC2. O grupo controle e diabético foram claramente sobrepostos, tanto no PCA, assim como no dendograma, com isolamento do grupo obeso. De fato, as alterações da proteômica no nosso estudo foram mais evidentes na obesidade do que no diabetes tipo I, o que pode ser justificado pelas alterações metabólicas que a obesidade promove, acarretando o diabetes tipo II (1). Apesar das diferenças entre o tipo I e II do diabetes, a obesidade crônica pode promover resistência à insulina e posteriormente a morte das células β -pancreáticas produtoras desse hormônio, evento semelhante ao que ocorre na diabetes tipo I (SBEM, 2014). As mesmas características foram observadas no *heatmap*, no qual a expressão das proteínas foi mais evidentemente diferenciada em todos os animais do grupo obeso.

Interessantemente, na ontologia gênica, a qual descreve as funções moleculares, processo biológico e compartimento celular ligadas às proteínas dos grupos controle, diabético e obeso, os quais foram semelhantes, indicando que os grupos proteicos não houveram variações muito evidentes, embora no grupo diabético foram identificados um número maior de processos biológicos. Liu et al. (78) compararam o perfil proteico das células espermáticas de homens normais e obesos com astenozoospermia, e encontraram na análise da ontologia gênica como principal componente celular as organelas 59%, com função molecular de atividade catalítica (48%), a maioria associada ao processo celular (74%), processo metabólico, organização dos componentes celulares e biogênese do componente celular, o que se assemelha aos nossos resultados. A análise do banco de dados da via KEGG indicou que as proteínas diferencialmente expressas estão relacionadas principalmente ao ribossomo, proteassoma, bem como ao metabolismo da frutose e manose.

Em nossos achados, a maioria das proteínas espermáticas encontradas no grupo obeso foram envolvidas com a respiração celular, na via da glicólise e produção de ATP.

O aumento de glicose intracelular (79) pode ter contribuído para a maior expressão de proteínas relacionadas com a produção de energia nas células espermáticas.

O VIP score determinou 15 proteínas importantes nos grupos estudados, as quais serão discutidas de acordo com suas funções. As proteínas estruturais, localizadas no citoesqueleto foram *outer dense fiber protein 2/outer dense fiber of sperm tails 2 (ODFs2)*, *isoform CRA_e citoesqueleto, tubulin beta chain/tubulin beta-4B chain (Tubb4bs)* e *keratin, type II cytoskeletal 5 (KRT1)*.

As *ODFs* (A0A0H2UHM4 e A0A0G2JSV6) são proteínas estruturais do flagelo das células espermáticas, com função de manter a elasticidade do movimento. Os flagelos espermáticos contem arranjo axonemal composto por 9 microtúbulos periféricos e dois centrais, circundado por fibras densas externas e bainha fibrosa. Quaisquer defeitos nessas estruturas resultam em morfologia aberrante, os quais comprometem a motilidade, reação do acrossomo e capacitação espermática. Desta forma, estas proteínas podem ser consideradas marcadoras da infertilidade masculina (80). No presente estudo as *ODFs* foram encontradas diminuídas no grupo diabético, que apresentaram maiores anormalidades morfológicas, tanto de cabeça quanto de cauda. Como essas proteínas são responsáveis por garantir que as fibras densas mantenham elasticidade flagelar, protegendo contra forças de cisalhamento, durante a ejaculação e transporte epididimal, quando seus níveis são alterados, levam a danos na morfologia, justificando maior quantidade de anormalidades (81). Essas proteínas são encontradas em níveis baixos em homens com globozoospermia (82). Já no grupo obeso essas proteínas foram encontradas aumentadas quando comparadas ao grupo controle, podendo levar às mesmas afecções. Em um estudo feito em camundongos a maior expressão das *ODFs* foi encontrada em animais inférteis, com defeitos morfológicos evidentes da cauda, comprometendo a motilidade (83,84).

Os microtúbulos são estruturas do citoesqueleto do espermatozoide relacionadas com a motilidade (85) e envolvidas na capacitação (86) e ligação entre os gametas durante a fertilização. As isoformas de *Tubbs* (G3V7C6 e Q6P9T8) são proteínas constituintes dos microtúbulos e são encontradas no axonema (cauda) e no segmento pós-acrossomal (cabeça). Em humanos, a baixa expressão de β -*tubulin* foi relacionada com astenozoospermia e mais acentuada no grupo astenoteratozoospermia. As β -*tubulin* são descritas como possível marcador das alterações morfológicas do espermatozoide (85). No presente estudo as *Tubb4bs* foram encontradas menos expressas no grupo diabético, podendo os espermatozoides sofrerem as mesmas alterações supracitadas. O nosso estudo

não avaliou a motilidade espermática, contudo em humanos com diabetes tipo I espontânea (87) e ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina (88,89) apresentam redução da motilidade o que confirma os nossos resultados em relação a correlação entre a menor expressão das tubulinas e a baixa motilidade espermática nos diabéticos. Ademais, a baixa expressão de tubulinas está relacionada com o aumento dos defeitos espermáticos (85), o que foi observado neste mesmo grupo. Já no grupo obeso, as *Tubb4bs* foram encontradas com maior expressão (G3V7C6) e menor expressão (Q6P9T8), apesar disso, os defeitos morfológicos espermáticos foram mais acentuados neste grupo, quando comparado com o controle. Neste grupo também não foi avaliada a motilidade espermática, contudo essa característica é reduzida em humanos obesos (90), o que justificaria a redução das *Tubb4s* neste grupo. Acreditamos que a maior expressão destas proteínas no grupo obeso possa estar relacionada com um efeito compensatório, já que os animais deste grupo foram mantidos por um longo período na dieta de cafeteria associada com água contendo sacarose.

A *KRT1* (A0A0G2K509) é uma proteína relacionada ao movimento do espermatozoide e organização estrutural, presente nos filamentos intermediários (91). Em humanos astenozoospermicos, a *KRT1* foi encontrada com maior expressão e relacionada com um efeito compensatório, já que neste grupo a taxa de fosforilação da tirosina foi comprometida (92). Nos grupos obesos e diabético a expressão da *KRT1* foi menor em comparação ao controle, o que significa que tanto a fosforilação da tirosina possa estar comprometida, assim como os processos que a proteína está envolvida, como hiperativação espermática o que permite a ligação à zona pelúcida (91).

Existe uma abundante rede de proteínas que estão envolvidas na produção de energia para o movimento espermático, devido à sua grande demanda (93). No nosso estudo, 6 proteínas descritas no VIP score foram relacionadas com o processo de respiração celular: *ATP synthase subunit beta (ATPase)*; *dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex mitochondrial (Dlat)*; *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)*; *cytochrome c, testis-specific (Cyt)*; *protein/nucleic acid deglycase (DJ-1)*; *phosphoglycerate kinase (Pgk2)*.

A *ATPase* (G3V6D3) possui domínio hidrofílico incorporado ao espaço intermembranoso mitocondrial, dividida em três subunidades catalíticas responsável pela transdução energética, sintetizando o ATP a partir de ADP e fósforo durante a fosforilação oxidativa (94), e desta maneira, fornecendo energia para atividade metabólica (95). Acredita-se que essa proteína esteja relacionada com a capacitação

espermática como demonstrado em espermatozoides de hamsters (96), ratos (97) e humanos (98). A redução em 20% da fertilidade em *Drosophila* foi correlacionada com a menor expressão da *ATPase* (99), o que foi relacionada com a baixa motilidade espermática (100) e pode ser considerada um marcador molecular para esta característica (101). No presente estudo houve uma diminuição da *ATPase* nos diabéticos podendo indicar uma diminuição desses parâmetros frente a essa doença, conforme já descrito anteriormente (87–89).

Já no grupo obeso a *ATPase* foi encontrada aumentada em relação ao controle. Em galos, houve maior expressão do RNAm de subunidades da *ATPase* em amostras com maior motilidade espermática (93), e em resposta cadeia respiratória mitocondrial há um aumento na produção de EROs intracelular, o que não alterou a qualidade espermática (102). Apesar do nosso estudo não determinar diferença significativa na peroxidação lipídica espermática a maior expressão da *ATPase* pode ser compensatória, já que amostras de espermatozoides obtidas de homens obesos apresentam menor motilidade (90).

A *Dlat* (M0R6Y8) é uma proteína do complexo multi-enzimático da desidrogenase de piruvato, que se encontra na matriz mitocondrial e catalisa a descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico, dando origem a acetil CoA, NADH e CO₂. Acredita-se que essa proteína esteja envolvida na capacitação e hiperativação espermática em hamster, o que pode estar comprometida nos diabéticos e obesos do nosso estudo, já que apresentaram menor expressão (103,104).

A proteína *G3PDH* (B1WBQ8) é uma enzima glicolítica dependente de NAD⁺ que catalisa a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato produzindo 1,3-difosfoglicerato e fosfato inorgânico, o qual precede os dois passos de geração de ATP na glicólise. Desta maneira, alterações em seus níveis (105), podem bloquear o processo de produção de ATP glicolítico no espermatozoide de ratos e humanos (106,107). Os testículos de pacientes acometidos tem peso e histologia normais, porém há redução na taxa de fertilização/parição e menor motilidade espermática, (107), em vista da maior parte da energia, utilizada para o funcionamento da célula, ser gerada pela glicólise (108), indicando que essa via é essencial para a motilidade e fertilidade espermática. Os estudos *in vitro* sugerem o envolvimento da *G3PDH* na ligação do espermatozoide à zona pelúcida do ócito, estando presente na cabeça do espermatozoide (109), sendo também encontradas nos testículos e epidídimos. Nos testículos humanos e de ratos, está presente no citoplasma de todas as células espermatogênicas e nos epidídimos, na cauda do

espermatozoide. A enzima está localizada na principal parte do flagelo espermático e quando diminuída pode inibir a motilidade espermática e a penetração na zona pelúcida (110). Ademais há correlação entre a via metabólica glicolítica e o movimento flagelar no espermatozoide de camundongos, sendo necessária para motilidade via produção de ATP mitocondrial (111). Em nossos achados a *G3PDH* foi menos expressa nos diabéticos, o que pode ser justificada pela baixa motilidade espermática nesse grupo (88,89) e aumentada nos obesos, o que pode estar relacionado a uma compensação, já que a motilidade espermática é reduzida neste grupo (90).

O *cytc* (P10715) foi menos expresso nos grupos diabético e obeso, quando comparados ao controle. No nosso conhecimento, não há relatos do *cytc* nos espermatozoides de ratos diabéticos ou obesos, porém já foi mencionada maior expressão dessa proteína em machos inférteis, o que foi relacionada com sua função apoptótica, pois leva a uma alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, que resulta na sua liberação no citosol, podendo desencadear a ativação das caspases (112). É considerada importante para regulação da quantidade e qualidade de espermatozoides produzidos, e a redução dos níveis dessa proteína pode levar a danos celulares, por alterar os níveis de ATP e assim a motilidade, perda da função antioxidante, afetando a fertilidade. Essas alterações são relacionadas com o envelhecimento (113). É uma proteína transportadora de elétrons mitocondrial entre o complexo III e complexo IV, presente na membrana externa e interna. Ainda, desempenha importante papel no apoptose. Possui três funções principais, transferência de elétrons, apoptose e anti-oxidação (114). Acreditamos que a redução da expressão *cytc* seja uma confirmação que apesar de todas as alterações metabólicas relacionadas a obesidade e ao diabetes, animais doentes não apresentam infertilidade, mantendo ainda níveis baixos dessa proteína, impedindo a apoptose espermática.

A *DJ-1* (O88767) também conhecida como *CAP-1* ou *SP22* é uma proteína homóloga a de humanos. É primeiramente expressa no espermatócito secundário durante a espermatogênese, e no espermatozoide ejaculado está localizado na parte posterior da cabeça, na parte anterior da peça intermediária e nos flagelos, tendo importante função na maturação espermática (115,116). A diminuição da *DJ-1* em amostras de sêmen de homens (115), ratos (116), camundongos (117), hamster (118), coelhos (119), carneiro (120) e cavalo (121) está relacionada com a infertilidade, por estar envolvida na fertilização. Estudo realizado em ratos sobre os efeitos tóxicos espermáticos (ornidazol ou epiclórídina) determinaram correlação da redução da expressão da *DJ-1* e a

motilidade espermática. Essa proteína é a menos expressa em homens astenozoospermicos. A infertilidade relacionada pode ocorrer em vista da disfunção mitocondrial, em condições de estresse oxidativo, causada pela diminuição dos níveis da *DJ-1* intensificando os danos induzidos por EROs(122). Esses achados corroboram com os nossos, uma vez que essa proteína foi encontrada diminuída em ambos os grupos tratados, obesos e diabéticos, apesar de não haver nenhum aumento das EROs no grupo estudado.

A proteína *Pgk2* (M0R6Y8) é uma isoenzima da linha germinativa masculina que tem como função catalisar etapas sucessivas da via glicolítica em espermatozoides de mamíferos, sendo a precursora da via metabólica para produção de ATP. Alterações em seus níveis, podem afetar a fosforilação de inúmeras proteínas, que regulam a função espermática, a produção de ATP (123), sendo importante para a reação do acrossomo e capacitação, já que a célula necessita de energia para desempenhar sua função (124), comprometendo a capacidade do espermatozoide desenvolver motilidade progressiva, culminando na infertilidade (125). Em nossos achados, a *Pgk2* se encontrou menos expressa em ambos os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle, corroborando com os achados de Liu et al. (126) que encontrou diminuição em sua expressão em homens astenozoospermicos, encontraram baixa expressão de *Pgk* nos testículos de homens idosos. Além disso, com imunofluorescência, demonstram que as *Pgks*, estão localizadas na peça principal, local primordial para a produção de ATP, afetando a penetração do espermatozoide no muco cervical. Essa proteína é considerada um potencial alvo terapêutico ou biomarcador para o diagnóstico da infertilidade masculina (123).

Outras proteínas identificadas com diferentes funções e localização foram: *lysozyme c* (*SLLP1*), *Ras-related protein Rab-2^a* (*RAB2A*), *CD177 antígeno-like* (*CD177*) e *globin c2* (*Hba-a2*).

A *lysozyme c* (F1M6E7) é conhecida como proteína bacteriolítica, encontrada em mamíferos, protegendo-os contra infecção de microrganismos invasores, presente em tecidos e fluidos corporais em humanos e camundongos (127). Contudo, em humanos encontraram uma proteína semelhante *lysozyme c*, codificada pelo mesmo gene *SPACA3*, localizada na região acrossomal, não possui ação bacteriolítica (127). Essa proteína foi encontrada em nossos estudos e foi denominada de *SLLP1*. Está localizada no gameta masculino, antes e após a reação do acrossomo, e possui sítios de ligação (*sperm acrossomal SLLP1 binding - SAS1B*) responsivos a proteína em oócitos de ratas (127).

Em nossos achados, a *lysozyme c* foi menos expressa no grupo diabético e aumentadas no obeso, quando comparado ao grupo controle.

A *RAB2A* (F1LP82) pertence as proteínas *GTPases* de baixa massa molecular, que modulam o transporte de microvesículas e exossomos das células eucarióticas (128). Essa proteína foi encontrada aumentada em espermatozoides de ratos com baixa motilidade e com baixo tamanho de ninhada. Em nossos achados essa proteína foi menos expressa no grupo obeso, o que também nos faz acreditar que seja compensatória a resposta. Já no diabético maior expressão foi observada, o que pode estar relacionada a baixa motilidade espermática (129). Esta proteína pode ser indicada como biomarcadora para diagnóstico e prognóstico da fertilidade masculina (78).

A *CD177* (M0R4W1) é um antígeno exclusivamente expresso em neutrófilos, regulando a migração dos leucócitos para o órgão alvo. É expressa no testículo e é vista como uma estratégia para terapia contra o câncer, pois atua na resposta imune. Os neutrófilos correspondem a 50-60% dos leucócitos seminais, sua origem não é bem compreendida, embora acredita-se que são provenientes da vesícula seminal e próstata e migram em resposta a inflamações nesses locais. O aumento do número de neutrófilos no sêmen caracteriza uma alteração denominada leucocitospermia, ou seja, contagens de leucócitos acima de 1 milhão/mL no ejaculado.(130) Os leucócitos geram EROs (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio), os quais provocam o estresse oxidativo e podem danificar os espermatozoides, contribuindo com 30 a 80% dos casos de infertilidade masculina. Essa proteína foi encontrada aumentada nos obesos, podendo indicar uma proliferação de neutrófilos, culminando nas afecções supracitadas, corroborando com esses achados, mas foi encontrada diminuída nos diabéticos, não sendo interessante por ser células do sistema imune, importante para o controle de inflamações, e acredita-se que estejam envolvidos na seleção de espermatozoides viáveis, por apoptose (131).

Conclusão

Os dados da literatura são limitados, há poucos trabalhos com proteômica de espermatozoide frente a obesidade e diabetes, dos poucos trabalhos encontrados, os resultados diferem dos nossos achados. Pode ser o tempo de indução da obesidade, ou a metodologia de indução para ambas as doenças. De fato, essas doenças afetam o perfil proteico de células espermáticas, como vimos em nossos resultados foram relatadas proteínas não identificadas em estudos anteriores. Assim, essas descobertas podem tornar marcadores da fertilidade em machos, utilizados para compreender melhor como alteram

os parâmetros reprodutivos. É importante, em conjunto com o estudo da reprodução, entender a nível sistêmico, como a síndrome metabólica está ligada a fisiologia e funcionalidade do órgão reprodutor, no intuito de melhor compreendermos o impacto das alterações proteômicas associadas à obesidade e ao diabetes na função espermática.

1. Pedersen SD. Metabolic complications of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet] 2013;27(2):179–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.004>
2. Petroianu A, Alberti LR, Antonio M, Melo B De. Relação entre diabetes mellitus e fertilidade masculina. *Einstein* [Internet] 2009;7(31):407–10. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/238738244>
3. Singla P, Bardoloi A, Parkash A. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes* [Internet] 2010;1(3):76–88. Available from: <http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v1/i3/76.htm>
4. Pontes DA, Fernandes GSA, Piffer RC, Gerardin DCC, Pereira OCM, Kempinas WG. Ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: The role of testosterone. *Pharmacol Reports* [Internet] 2011;63(1):130–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70407-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70407-8)
5. Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol* [Internet] 2012;9(6):330–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2012.77>
6. Kashou AH, du Plessis SS, Agarwal A. The Role of Obesity in ROS Generation and Male Infertility [Internet]. In: Springer Science & Business Media. 2012. p. 670. Available from: <http://ejh.it/index.php/ejh/article/view/ejh.2012.br9>
7. Kraemer RR, Acevedo EO, Synovitz LB, Hebert EP, Gimpel T, Castracane VD. Leptin and steroid hormone responses to exercise in adolescent female runners over a 7-week season. *Eur J Appl Physiol* 2001;86(1):85–91.
8. Dudas B, Merchenthaler I. Three-dimensional representation of the neurotransmitter systems of the human hypothalamus: Inputs of the gonadotrophin hormone-releasing hormone neuronal system. *J Neuroendocrinol* 2006;18(2):79–95.
9. Fernandez CDB, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF, et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9(32):1–10.

10. Barbosa KBF, Costa NMB, De Cássia Gonçalves Alfenas R, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr* 2010;23(4):629–43.
11. Karimi J, Goodarzi MT, Tavilani H, Khodadadi I, Amiri I. Relationship between advanced glycation end products and increased lipid peroxidation in semen of diabetic men. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet] 2011;91(1):61–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2010.09.024>
12. Houseknecht KL, Portocarrero CP. Leptin and its receptors: Regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol* 1998;15(6):457–75.
13. Ehrhardt RA, Slepatis RM, Bell AW, Boisclair YR. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 2001;21(2):85–96.
14. Andreollo NA, Freitas E, Araújo MR, Lopes LR. Artigo de Revisão IDADE DOS RATOS VERSUS IDADE HUMANA: QUAL É A RELAÇÃO? *Arq Bras Cir Dig* 2012;25(1):49–51.
15. SANTOS JH DOS. DIETA DE CAFETERIA E SEU IMPACTO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PREDITIVOS DA SÍNDROME METABÓLICA EM MODELO EXPERIMENTAL. 2016;
16. Delfino V, Figueiredo J, Matsuo T, Favero M. Streptozotocin-induced diabetes mellitus : long-term comparison of two drug administration routes. *J Bras Nefrol* 2002;24(1):31–6.
17. SILVA RF DA. Efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a espermatogênese de ratos pré-púberes e adultos . Estudo experimental . 2007;110.
18. BERNARDIS LL, PATTERSON BD. CORRELATION BETWEEN “LEE INDEX” AND CARCASS FAT CONTENT IN WEANLING AND ADULT FEMALE RATS WITH HYPOTHALAMIC LESIONS. *J Endocr* 1967;40:527–8.
19. Angéloco LRN, Deminice R, Leme IDA, Lataro RC, Jordão AA. Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: Effects of high-fat and high-sucrose diets. *Rev Nutr* 2012;25(3):331–9.
20. Malafaia AB, Afonso P, Nassif N, Marcondes P, Ariede BL, Sue KN, et al. OBESITY INDUCTION WITH HIGH FAT SUCROSE IN RATS. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2013;26(Suplemento 1):17–21.
21. Kanazawa MY, Scott C, Wilges CH de M, Dias LGGG, de Souza FF. CORRELAÇÃO DA CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL, CITOLOGIA TESTICULAR E PARÂMETROS DO SÊMEN DO EPIDÍDIMO DE TOUROS.

- Enciclopédia Biosf 2012;8(15):517–27.
22. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* [Internet] 2010;11(5):373–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1863>
 23. Guasti PN, Freitas-Dell'Aqua CP, Maziero RRD, Hartwig FP, Monteiro GA, Lisboa FP, et al. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. *Anim Reprod* [Internet] 2012;9(4):929. Available from: papers3://publication/uuid/7ED164B7-6003-4B4F-B939-1B55DD9E6494
 24. Souza FF, Chirinéa VH, Martins MIM, Lopes MD. Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod Domest Anim* 2009;44(SUPPL. 2):283–6.
 25. Xia J, Wishart DS. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinforma* 2016;14(10):1–14.
 26. Checa A, Bedia C, Jaumot J. Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. *Anal Chim Acta* 2015;885:1–16.
 27. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007;41(1):111–9.
 28. Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Cháfer-Rudilla M, Íñiguez De Onzoño L, Blázquez-Cabrera JA, Miralles-García JM. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. *J Androl* 2010;31(6):584–92.
 29. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab* 2007;5(3):167–79.
 30. Ferraz ASM, de Moraes RCM, de Sá NAR, Andrade FT, Martins M do CDC e, Ceccatto VM. Use of murinometrics indices and bioelectrical impedance (BIA) in the determination of experimental obesity in oophorectomized rats. *Acta Sci Biol Sci* [Internet] 2016;38(4):451. Available from: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/31714>
 31. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444(14):860–7.
 32. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes* 2003;27:S53–5.
 33. Dallak MA. Suppression of High Fat Diet-Induced Liver Cell Injury by Swim

- Exercise Supresión de Lesión en Células de Hígado Inducida por Dieta Alta en Grasas con Ejercicio de Natación. *Int J Morphol* [Internet] 2018;36(1):327–32. Available from: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v36n1/0717-9502-ijmorphol-36-01-00327.pdf>
34. Garolla A, Torino M, Miola P, Caretta N, Pizzol D, Menegazzo M, et al. Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. *Hum Reprod* 2015;30(5):1006–13.
 35. Ding G-L, Liu Y, Liu M-E, Pan J-X, Guo M-X, Sheng J-Z, et al. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian J Androl* 2015;17(6):948–53.
 36. Griffeth RJ, Carretero J, Burks DJ. Insulin Receptor Substrate 2 Is Required for Testicular Development. *PLoS One* 2013;8(5):1–11.
 37. Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Andò S. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology* 2005;146(2):552–7.
 38. Dallak MA. Suppression of High Fat Diet-Induced Liver Cell Injury by Swim Exercise Supresión de Lesión en Células de Hígado Inducida por Dieta Alta en Grasas con Ejercicio de Natación. *Int J Morphol* [Internet] 2018;36(1):327–32. Available from: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v36n1/0717-9502-ijmorphol-36-01-00327.pdf>
 39. Nery C da S, Pinheiro IL, Muniz G de S, de Vasconcelos DAA, de França SP, do Nascimento E. Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. *Rev Bras Med do Esporte* 2011;17(1):49–55.
 40. Sinzato YK, Lima PHO, Campos KE de, Kiss ACI, Rudge MVC, Damasceno DC. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55(4):384–8.
 41. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51(2):216–26.
 42. Manfredi-Lozano M, Roa J, Tena-Sempere M. Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. *Front Neuroendocrinol* [Internet] 2017;(May):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.07.008>

43. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article. *Dig Dis Sci* 2009;54(9):1847–56.
44. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc [Internet]* 2001;60(03):329–39. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665101000362
45. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: Emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 2003;24(4):225–53.
46. Sindelar DK, Havel PJ, Seeley RJ, Wilkinson CW, Woods SC, Schwartz MW. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* 2000;48(6):1275–80.
47. Wallach EE, Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS, Sc D. Goleman What Makes. 2002;77(3).
48. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol [Internet]* 2011;11(2):85–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2921>
49. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Borone M, Leopold L, Firedman J. positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425–32.
50. Isidori AM, Caprio M, Strollo F, Moretti C, Frajese G, Isidori A, et al. Leptin and androgens in male obesity: Evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3673–80.
51. Jope T, Lammert A, Kratzsch J, Paasch U, Glander HJ. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl* 2003;26(6):335–41.
52. Hofny ERM, Ali ME, Abdel-Hafez HZ, Kamal EED, Mohamed EE, Abd El-Azeem HG, et al. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril [Internet]* 2010;94(2):581–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.085>
53. Herder C, Carstensen M, Ouwens DM. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab* 2013;15(S3):39–50.
54. Xita N, Tsatsoulis A. Adiponectin in Diabetes Mellitus. *Curr Med Chem [Internet]* 2012;19(32):5451–8. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929->

8673&volume=19&issue=32&spage=5451

55. Saraheimo M, Forsblom C, Thorn L, Wadén J, Rosengård-Bärlund M, Heikkilä O, et al. Serum adiponectin and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* [Internet] 2008;31(6):1165--1169 5p. Available from:
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=c8h&AN=105767289&%5Cnlang=ja&site=ehost-live>
56. Kadowaki T, Kohjiro U, Kazuyuki T. Neonatal and child male circumcision: a global review. *J Clin Invest* [Internet] 2006;116(7):1784–92. Available from:
http://www.who.int/hiv/pub/malecircumcision/neonatal_child_MC_UNAIDS.pdf
57. Jia T, Carrero JJ, Lindholm B, Stenvinkel P. The complex role of adiponectin in chronic kidney disease. *Biochimie* [Internet] 2012;94(10):2150–6. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.024>
58. Tavridou A, Georgoulidou A, Roumeliotis A, Roumeliotis S, Giannakopoulou E, Papanas N, et al. Association of plasma adiponectin and oxidized low-density lipoprotein with carotid intima-media thickness in diabetic nephropathy. *J Diabetes Res* 2015;2015:1–8.
59. Yilmaz MI, Saglam M, Qureshi AR, Carrero JJ, Caglar K, Eyileten T, et al. Endothelial dysfunction in type-2 diabetics with early diabetic nephropathy is associated with low circulating adiponectin. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(5):1621–7.
60. Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly-Y M, William-Olsson L, Rhedin M, Peng XR, et al. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes* 2007;56(3):583–93.
61. Kasimanickam VR, Kasimanickam RK, Kastelic JP, Stevenson JS. Associations of adiponectin and fertility estimates in Holstein bulls. *Theriogenology* [Internet] 2013;79(5):766–77. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.001>
62. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation , stress , and diabetes. *J Clin Invest* [Internet] 2005;115(5):1111–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/s00125-016-3970-](http://dx.doi.org/10.1007/s00125-016-3970-z)
<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2011.193><http://www.hindawi.com/journals/jdr/2008/230837/><http://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aao1617><http://www.impactjournals.com/oncotarget><http://www.impactjournals.com/oncotarget>

63. Pickup J, Frerking D. Inflammation and Activated Innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(3):813–23.
64. Weisberg S, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel R, Ferrante A. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112(12):1796–808.
65. WAJCHENBERG BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue : Endocrine 2000;21(6):697–738.
66. Wu L, Xu B, Fan W, Zhu X, Wang G, Zhang A. Adiponectin protects Leydig cells against proinflammatory cytokines by suppressing the nuclear factor- κ B signaling pathway. *FEBS J* 2013;280(16):3920–7.
67. Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: Associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: A potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(4):972–8.
68. Pilatz A, Hudemann C, Wolf J, Halefeld I, Paradowska-Dogan A, Schuppe HC, et al. Metabolic syndrome and the seminal cytokine network in morbidly obese males. *Andrology* 2017;5(1):23–30.
69. Esposito K, Giugliano F, Di Palo C, Giugliano G, Marfella R, D’Andrea F, et al. Effect of Lifestyle Changes on Erectile Dysfunction in Obese Men. *Jama* 2004;291(24):2978–84.
70. GLASS AR, SWERDLOFF RS, BRAY GA, DAHMS WT, ATKINSON RL. Low Serum Testosterone and Sex-Hormone-Binding-Globulin in Massively Obese Men. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet] 1977;45(6):1211–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/338622>0Ahttps://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem-45-6-1211
71. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005;146(9):3686–92.
72. Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 1999;140(11):4939–47.
73. Pozza C, Isidori AM. What’s Behind the Obesity Epidemic. *Imaging Bariatric Surg* [Internet] 2018;88(10):1–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-49299-5>

74. Mizutani T, Enomoto T, Nomura T, Nishikawa Y, Adachi H, Ikegami H, et al. Identification of Estrogen Tissue and Adipocytes Adipose. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(8):950–4.
75. Yan SF, Yan S Du, Ramasamy R, Schmidt AM. Tempering the wrath of RAGE: An emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. *Ann Med* 2009;41(6):408–22.
76. Talebi AR, Mangoli E, Nahangi H, Anvari M, Pourentezari M, Halvaei I. Vitamin C attenuates detrimental effects of diabetes mellitus on sperm parameters, chromatin quality and rate of apoptosis in mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet] 2014;181:32–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.07.007>
77. Magnusdottir E V., Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 2005;20(1):208–15.
78. Liu Y, Guo Y, Song N, Fan Y, Li K, Teng X, et al. Proteomic pattern changes associated with obesity-induced asthenozoospermia. *Andrology* 2014;3(2):247–59.
79. Hammerstedt H, Hd- G. Transport and Phosphorylation by Bovine Sperm ' inhibited studies ' Supported of Child Health and Human. *Biol Reprod* 1978;19:368–79.
80. Silflow CD. Assembly and Motility of Eukaryotic Cilia and Flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 2002;127(4):1500–7.
81. Baltz JM, Williams PO, Cone RA. Dense Fibers Protect Mammalian Sperm against Damage. *Biol Reprod* 1990;43:485–91.
82. Liao TT, Xiang Z, Zhu WB, Fan LQ. Proteome analysis of round-headed and normal spermatozoa by 2-D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Asian J Androl* [Internet] 2009;11(6):683–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2009.59>
83. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reproduction* 2004;127(3):335–42.
84. Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FLC, Björndahl L, Ashton PR, et al. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: Case

- report. *Hum Reprod* 2004;19(6):1438–47.
85. Pêknicová J, Kubátová A, Sulimenko V, Dráberová E, Viklický V, Hozák P, et al. Differential Subcellular Distribution of Tubulin Epitopes in Boar Spermatozoa: Recognition of Class III β -Tubulin Epitope in Sperm Tail1. *Biol Reprod* 2005;65(3):672–9.
 86. Lefièvre L, Chen Y, Conner SJ, Scott JL, Publicover SJ, Ford WCL, et al. Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: An alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics* 2007;7(17):3066–84.
 87. Padrón RS, Dambay A, Suárez R, Más J. Semen analyses in adolescent diabetic patients. *Acta Diabetol Lat* 1984;21(2):115–21.
 88. Kim ST, Moley KH. Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression. *Reproduction* 2008;136(3):313–22.
 89. Seethalakshmi L, Menon M, Diamond D. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol* [Internet] 1987;138(1):190–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)43042-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(17)43042-4)
 90. Bieniek JM, Kashanian JA, Deibert CM, Grober ED, Lo KC, Brannigan RE, et al. Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men. *Fertil Steril* [Internet] 2016;106(5):1070–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.06.041>
 91. Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human Sperm Tail Proteome Suggests New Endogenous Metabolic Pathways. *Mol Cell Proteomics* 2012;12(2):330–42.
 92. Hashemitabar M, Sabbagh S, Orazizadeh M, Ghadiri A, Bahmanzadeh M. A proteomic analysis on human sperm tail: Comparison between normozoospermia and asthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(6):853–63.
 93. Zhang JJ, Do HL, Chandimali N, Lee SB, Mok YS, Kim N, et al. Non-thermal plasma treatment improves chicken sperm motility via the regulation of demethylation levels. *Sci Rep* [Internet] 2018;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26049-5>
 94. Cross RL, Müller V. The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and

- ATPases: Reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Lett* 2004;576(1–2):1–4.
95. Walker JE, Powell SJ, Viñas O, Runswick MJ. ATP Synthase from Bovine Mitochondria: Complementary DNA Sequence of the Import Precursor of a Heart Isoform of the α Subunit. *Biochemistry* 1989;28(11):4702–8.
 96. Kota V, Dhople VM, Shivaji S. Tyrosine phosphoproteome of hamster spermatozoa: Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in sperm capacitation. *Proteomics* 2009;9(7):1809–26.
 97. Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 2008;52(5–6):463–72.
 98. Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, et al. Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm. *J Biol Chem* 2003;278(13):11579–89.
 99. Collins CM, Malacrida B, Burke C, Kiely PA, Dunleavy EM. ATP synthase F1 subunits recruited to centromeres by CENP-A are required for male meiosis. *Nat Commun* [Internet] 2018;9(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05093-9>
 100. Huang YL, Fu Q, Yang L, Guan JL, Pan H, Chen FM, et al. Differences between high- and low-motility buffalo sperm identified by comparative proteomics. *Reprod Domest Anim* 2015;50(3):443–51.
 101. Jagan Mohanarao G, Atreja SK. Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Res Vet Sci* [Internet] 2012;93(2):618–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.017>
 102. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* 2014;94(3):909–50.
 103. Zhou ZH, McCarthy DB, O'Connor CM, Reed LJ, Stoops JK. The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc Natl Acad Sci* 2002;98(26):14802–7.
 104. Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity¹. *Biol Reprod* 2009;82(1):96–104.
 105. Sevostyanova IA, Kulikova K V., Kuravsky ML, Schmalhausen E V., Muronetz

- VI. Sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is expressed in melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 2012;427(3):649–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.115>
106. Welch J, Brown P, O'Brien DA, Magyar P, Bunch D, Mori C, et al. Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells. *J Androl* [Internet] 2000;21(2):328–338. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10714828%5Cnpapers2://publication/uuid/C1F2FEDA-0871-434C-8E47-CF9D3530377F
 107. Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, et al. a Sperm-Specific Glycolytic Enzyme , Is Required for Sperm Motility and Male Fertility. *Sci York* 2004;101(47):16501–16506.
 108. Fraser LR, Quinn PJ. A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil* [Internet] 1981;61(1):25–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7452624>
 109. Margaryan H, Dorosh A, Capkova J, Manaskova-Postlerova P, Philimonenko A, Hozak P, et al. Characterization and possible function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-spermatogenic protein GAPDHS in mammalian sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13(1):1–9.
 110. Liu J, Sun CM, Zhang CL, Wang X, Li JY. Location and characterization of GAPDS in male reproduction. *Urol Int* 2013;90(4):449–54.
 111. Takei GL, Miyashiro D, Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. *J Exp Biol* 2014;217(11):1876–86.
 112. Liu Z, Lin H, Ye S, Liu Q -y., Meng Z, Zhang C -m., et al. Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103(24):8965–70.
 113. Angrimani DSR, Losano JDA, Rui BR, Bicudo LC, Andrade AF., Arruda RP, et al. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. *Rev Bras Reprodução Anim* 2015;39(2):277–83.
 114. Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 1998;44(8 I):1616–20.

115. Welch E, Klinefelter R, Roberts L. Fertility Protein From a Highly Conserved Gene Breakthrough in Andrology. *J Androl* 1998;19(4):385–93.
116. Wagenfeld A, Gromoll J, Cooper TG. Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1 (CAP1), a protein putatively involved in fertilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251(2):545–9.
117. Okada M, Matsumoto K, Niki T, Taira T, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. DJ-1, a Target Protein for an Endocrine Disrupter, Participates in the Fertilization in Mice. *Biol Pharm Bull* 2002;25(7):853–6.
118. Klinefelter GR, Welch JE, Perreault SD, Moore HD, Zucker RM, Suarez JD, et al. Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility in vivo and in vitro. *J Androl* [Internet] 2002;23(1):48–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780923>
119. Veeramachaneni DNR, Palmer JS, Klinefelter GR. Chronic exposure to low levels of dibromoacetic acid, a water disinfection by-product, adversely affects reproductive function in male rabbits. *J Androl* 2007;28(4):565–77.
120. Favareto APA, Rodello L, Taconeli CA, Bicudo SD, Klinefelter GR, Kempinas WG. Identification of the SP22 sperm protein in santa inês and dorper rams. *Reprod Domest Anim* 2010;45(2):323–30.
121. Miller LMJ, Woodward E, Campos JR, Troedsson MHT. Expression of sperm protein at 22 kDa (SP22) on equine spermatozoa prior to and following heat-induced testicular degeneration. *Anim Reprod Sci* 2010;121(1–2):148.
122. An CN, Jiang H, Wang Q, Yuan RP, Liu JM, Shi WL, et al. Down-regulation of DJ-1 protein in the ejaculated spermatozoa from Chinese asthenozoospermia patients. *Fertil Steril* [Internet] 2011;96(1):19–23.e2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.048>
123. Danshina P V., Geyer CB, Dai Q, Goulding EH, Willis WD, Kitto GB, et al. Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice1. *Biol Reprod* 2009;82(1):136–45.
124. Huang Z, Danshina P V., Mohr K, Qu W, Goodson SG, O'Connell TM, et al. Sperm function, protein phosphorylation, and metabolism differ in mice lacking successive sperm-specific glycolytic enzymes. *Biol Reprod* 2017;97(4):586–97.
125. Shen S, Wang J, Liang J, He D. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J Urol* 2013;31(6):1395–401.

126. Liu B, Wang P, Wang Z, Jia Y, Niu X, Wang W, et al. Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2010;27(12):719–24.
127. Herrero MB, Mandal A, Digilio LC, Coonrod SA, Maier B, Herr JC. Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization. *Dev Biol* 2005;284(1):126–42.
128. Short B, Preisinger C, Körner R, Kopajtich R, Byron O, Barr FA. A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. *J Cell Biol* 2001;155(6):877–83.
129. Rahman MS, Lee J-S, Kwon W-S, Pang M-G. Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception. *Int J Endocrinol* 2013;2013:1–11.
130. Pullar JM, Carr AC, Bozonet SM, Rosengrave P, Kettle AJ, Vissers MCM. Elevated seminal plasma myeloperoxidase is associated with a decreased sperm concentration in young men. *Andrology* 2017;5(3):431–8.
131. Alghamdi AS, Foster DN. Seminal DNase Frees Spermatozoa Entangled in Neutrophil Extracellular Traps. *Biol Reprod* 2005;73(6):1174–81.

Supplement 1. Results of mass spectrometry and gene ontology of proteins extracted from sperm cells of rats. Genetic ontology obtained at UniprotKB (www.uniprot.org).

Name protein	ID	Gene	Mass (Da)	Genetic ontology		
				Molecular function	Biological process	Cellular compartment
Tubulin beta-4B chain	Q6P9T8	Tubb4b	50225	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton:	Microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization ; mitotic cell cycle	Cytoplasm, cytoskeleton, microtubule
ATP synthase subunit beta	G3V6D3	Atp5f1b	56309	Angiostatin binding; sATP binding; MHC class I protein binding; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Angiogenesis; ATP synthesis coupled proton transport; cellular response to interleukin-7; lipid metabolic process; negative regulation of cell adhesion involved in substrate-bound cell migration; positive regulation of blood vessel endothelial cell migration; regulation of intracellular pH	Mitochondrion; mitochondrial nucleoid mitochondrial; proton-transporting ATP synthase complex; plasma membrane; cell surface; proton-transporting; ATP synthase complex, catalytic core F(1)
Cytochrome c, testis-specific	P10715	Cyct	11849	Electron transfer activity Source;; binding; metal ion binding	Apoptotic process; mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen; mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	Mitochondrion,mitochondrial intermembrane; respirasome
Outer dense fiber protein 2	A0A0H2UHM4	Odf2	94159	--	--	--
Mitochondria-eating protein	A0A0H2UHA4	Spata18	68665	--	Cellular response to DNA damage stimulus; mitochondrial protein catabolic process, mitophagy by induced vacuole formation	Mitochondrion; mitochondrial outer membrane
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P31044	Pebp1	20902	ATP binding; kinase binding; lipid;binding; mitogen-activated protein kinase binding; protein kinase binding; receptor serine/threonine kinase binding; serine-type endopeptidase inhibitor activity; signaling receptor binding	Aging; eating behavior; hippocampus development; MAPK cascade; negative regulation of MAPK cascade negative regulation of protein phosphorylation; positive regulation of acetylcholine metabolic process; positive regulation of cAMP-mediated signaling; positive regulation of mitotic nuclear division; regulation of neurotransmitter levels; regulation of the force of heart contraction response to activity; response to calcium ion; response to cAMP; response to corticosterone; response to drug; response to electrical stimulus; response to ethanol; response to heat; response to organic cyclic compound;	Cytoplasm; membrane; peripheral membrane protein

					response to organic substance; response to organonitrogen compound response to oxidative stress; response to toxic substance; response to wounding; spermatid development ; sperm capacitation	
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	P11240	Cox5a	16347	Cytochrome-c oxidase activity; metal ion binding	Mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen	Mitochondrion; mitochondrion inner membrane
Globin a4	A0A0G2JSW3	Hbb	16069	Heme binding; Metal ion binding; oxygen binding; oxygen carrier activity	Oxygen transport; transport; heme; iron; metal-binding	Cytosol; hemoglobin complex
Hemoglobin subunit alpha-1/2	P01946	Hba1	15490	Amyloid-beta binding; heme binding; iron ion binding; organic acid binding; oxygen binding; oxygen carrier activity	Cellular oxidant detoxification; hydrogen peroxide catabolic process; negative regulation of blood pressure; protein heterooligomerization; regulation of sensory perception of pain	Cytosol; hemoglobin complex; haptoglobin-hemoglobin complex; synapse
Tubulin alpha-3 chain	Q68FR8	Tuba3a	50612	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization, mitotic cell cycle	Cytoskeleton; ciliary basal body; microtubule; cytoplasm
Sperm surface protein Sp17	Q9Z1K2	Spa17	17142	Calmodulin binding	Binding of sperm to zona pellucida	Plasma Membrane; external side of plasma membrane; cilium; cytoplasm; sperm fibrous sheath; sperm principal piece
Malate dehydrogenase, mitochondrial	P04636	Mdh2	36117	L-malate dehydrogenase activity; malate dehydrogenase (NADP+) activity; malate dehydrogenase activity; protein homodimerization activity; protein self-association	Carbohydrate metabolic process; internal protein amino acid acetylation; malate metabolic process; NADH metabolic process; oxaloacetate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion; mitochondrial matrix; mitochondrion; membrane
ATP synthase subunit delta, mitochondrial	G3V7Y3	Atp5f1d	17552	Proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP synthesis coupled proton transport	Mitochondrion; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
Actin, cytoplasmic 1	A0A0G2K3K2	Actb	42401	ATP binding; identical protein binding; kinesin binding; nitric-oxide synthase binding; protein kinase binding; structural constituent of postsynaptic actin cytoskeleton; Tat protein binding	Cell motility; cellular response to cytochalasin B; negative regulation of protein binding; regulation of norepinephrine uptake; regulation of protein localization to plasma membrane; regulation of transmembrane transporter activity; synaptic vesicle endocytosis	Cytoskeleton; cortical cytoskeleton; postsynaptic actin cytoskeleton; cytosol; cytosol; Nucleus; nuA4 histone acetyltransferase complex; calyx of Held; cytoplasmic ribonucleoprotein granule; glutamatergic synapse; schaffer collateral - CA1 synapse
Beta-defensin	Q99JD1	Defb22	11417	--	Defense response to bacterium; innate immune response	Extracellular region or secreted
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	P10888	Cox4i1	19559	Cytochrome-c oxidase activity	Mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen ; response to nutrient	Mitochondrion; mitochondrial respiratory chain complex IV; nucleus
Sperm acrosome-associated protein 9	Q4V8P4	Spaca9	19795	Calcium-dependent protein binding	--	Cytoskeleton; ciliary basal body; cytoplasmic microtubule; nucleus;

Basigin	P26453	Bsg	42865	Cell-cell adhesion mediator activity; mannose binding	Axon guidance; decidualization; dendrite self-avoidance; embryo implantation; homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules; odontogenesis of dentin-containing tooth; protein localization to plasma membrane; response to cAMP; response to mercury ion; response to peptide hormone	acrosomal vesicle; ciliary base; cytoplasm; sperm flagellum Plasma membrane; single-pass type I membrane protein; melanosome
Calmodulin-1	P0DP29	Calm1	16827	Adenylate cyclase activator activity; adenylate cyclase binding; calcium channel inhibitor activity; calcium channel regulator activity; calcium-dependent protein binding; calcium ion binding; disordered domain specific binding; ion channel binding; nitric-oxide synthase binding; nitric-oxide synthase regulator activity; N-terminal myristoylation domain binding; phosphatidylinositol 3-kinase binding; protein domain specific binding; protein kinase binding; protein N-terminus binding; protein phosphatase activator activity; titin binding; type 3 metabotropic glutamate receptor binding	Activation of adenylate cyclase activity; calcium-mediated signaling; detection of calcium ion; establishment of protein localization to membrane; establishment of protein localization to mitochondrial membrane; G2/M transition of mitotic cell cycle; negative regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity; positive regulation by host of symbiont cAMP-mediated signal transduction; positive regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity; positive regulation of DNA binding; positive regulation of nitric-oxide synthase activity; regulation of phosphoprotein phosphatase activity; positive regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity; regulation of cardiac muscle contraction; regulation of cytokinesis; regulation of heart rate; regulation of high voltage-gated calcium channel activity; regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum; regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity; regulation of store-operated calcium channel activity; regulation of synaptic vesicle endocytosis; regulation of synaptic vesicle exocytosis; response to amphetamine	Cytoskeleton; spindle; spindle pole
Succinyl-CoA:3-ketoacid transferase 2A, mitochondrial	coenzyme A Q5XIJ9	Oxct2a	57491	3-oxoacid CoA-transferase activity	Ketone body catabolic process	Mitochondrion
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	P32551	Uqcrc2	48423	Metal ion binding; metalloendopeptidase activity; protein-containing complex binding	Oxidation-reduction process; protein processing involved in protein targeting to mitochondrion	Mitochondrion; mitochondrion inner membrane

Citrate synthase	G3V936	Cs	52083	Citrate (Si)-synthase activity	Carbohydrate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion; mitochondrial matrix
Keratin, type II cytoskeletal 5	A0A0G2K509	Krt5	63095	Scaffold protein binding; structural molecule activity	--	Cytoskeleton; keratin filament; cytoplasm
Cytochrome c-1	D3ZFY8	Cyc1	35640	Electron transporter, transferring electrons within CoQH2-cytochrome c reductase complex activity; heme binding; metal ion binding	Mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport; mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	Mitochondrion; mitochondrial respiratory chain complex III
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	P07895	Sod2	24887	DNA binding; enzyme binding; identical protein binding; manganese ion binding; metal ion binding; oxygen binding; superoxide dismutase activity	Acetylcholine-mediated vasodilation involved in regulation of systemic arterial blood pressure; age-dependent response to reactive oxygen species; aging; cellular response to ethanol; detection of oxygen; erythropoietin differentiation; glutathione metabolic process; heart development; hemopoiesis; hydrogen peroxide biosynthetic; hydrogen peroxide metabolic process; intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage; intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress; iron ion homeostasis; liver development; locomotory behavior; negative regulation of apoptotic process; negative regulation of fat cell differentiation; negative regulation of fibroblast proliferation; neuron development; positive regulation of nitric oxide biosynthetic process; post-embryonic development; protein homooligomerization; regulation of catalytic activity; regulation of mitochondrial membrane potential; regulation of transcription by RNA polymerase II; release of cytochrome c from mitochondria; removal of superoxide radicals; respiratory electron transport chain; response to activity; response to axon injury; response to cadmium ion; response to cold; response to drug; response to electrical stimulus; response to gamma radiation; response to hydrogen peroxide; response to hyperoxia; response to hypoxia; response to immobilization stress; response to isolation stress; response to L-ascorbic acid; response to lipopolysaccharide; response to	Mitochondrion; mitochondrion matrix

Fructose-bisphosphate aldolase	Q6AY07	Aldoat2	39923	Fructose-bisphosphate aldolase activity	magnetism; response to manganese ion; response to nutrient levels; response to oxidative stress; response to radiation; response to selenium ion; response to silicon dioxide; response to zinc ion; superoxide anion generation; superoxide metabolic process	Glycolytic process	--
Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	Q8VI04	Asrgl1	34845	Asparaginase activity; beta-aspartyl-peptidase activity; hydrolase activity	Asparagine catabolic process via L-aspartate; protein maturation	Cytoplasm Source; photoreceptor inner segment	
Ropporin-1	Q4KLL5	Ropn1	24173	--	Cilium organization; flagellated sperm motility; protein localization to cilium; regulation of protein phosphorylation; sperm capacitation	Cytoplasm; sperm cytoplasmic droplet; sperm principal piece	
Uncharacterized protein	F1LUD3	N/A	586027	--	--	Costamere Source; cytoplasmic vesicle membrane; Z disc	
Hypothetical LOC302884	M0R6G0	MGC105649	9593	--	Response to bacterium	Nucleus	
GLIPR1-like 1	D3ZI91	Glipr111	27270	--	--	Extracellular region or secreted; extracellular space	
Phosphoglycerate kinase	M0R6Y8	RGD1560402	42391	ADP binding; ATP binding; phosphoglycerate kinase activity	Gluconeogenesis; glycolytic process; positive regulation of oxidative phosphorylation	Cytosol	
Acrosin-binding protein	Q6AY33	Acrbp	36236	--	--	Extracellular region or secreted; acrosomal membrane; acrosomal vesicle	
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 16	G3V8X9	Serpina16	47380	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular region or secreted	
ATP synthase subunit d, mitochondrial	P31399	Atp5pd	18809	Protein-containing complex binding; proton transmembrane transporter activity	ATP hydrolysis coupled cation transmembrane transport; ATP metabolic process; ATP synthesis coupled proton transport; cellular response to peptide	Mitochondrion; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o); mitochondrial proton-transporting ATP synthase, stator stalk	
Anionic trypsin-1	P00762	Prss1	26627	Metal ion binding; serine-type endopeptidase activity	Digestion; proteolysis; response to caffeine; response to nicotine; response to nutrient; response to organic substance	Extracellular region or secreted	
Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated	M0R8P3	Cabyr	43246	Calcium ion binding	Sperm capacitation	Cytosol, nucleus; sperm fibrous sheath	
Phosphoglycerate mutase 2	P16290	Pgam2	28908	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase activity; bisphosphoglycerate mutase activity;	Gluconeogenesis; glycolytic process; Notch signaling pathway; response to inorganic substance; response to mercury	Cytosol; nucleus	

Alpha-amylase	E9PSQ1	Amy1a	59633	cofactor binding; hydrolase activity; phosphoglycerate mutase activity Alpha-amylase activity; alpha-amylase activity (releasing maltohexaose); cation binding	ion; spermatogenesis; striated muscle contraction Carbohydrate metabolic process; response to bacterium	Extracellular region or secreted
Protein MENT	Q5XI62	Ment	38130	--	Regulation of cell population proliferation	Extracellular region or secreted
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	P12075	Cox5b	14191	Cytochrome-c oxidase activity; metal ion binding	Mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport; mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen; response to hormone; response to peptide hormone	Mitochondrion; mitochondrial inner membrane
Peroxiredoxin-like 2A	Q6AXX6	Prxl2a	25861	Antioxidant activity	Oxidation-reduction process; regulation of osteoclast differentiation	Extracellular region or secreted; cytoplasm
Zona pellucida binding protein, isoform CRA_b	Q6AXU2	Zpbp	46012	--	Binding of sperm to zona pellucida	Extracellular region or secreted; integral component of membrane
Slc25a17 protein	B2GUY8	Slc25a17	34433	ADP transmembrane transporter activity; AMP transmembrane transporter activity; ATP transmembrane transporter activity; chaperone binding; coenzyme A transmembrane transporter activity; FAD transmembrane transporter activity; transmembrane transporter activity; NAD transmembrane transporter activity	Fatty acid beta-oxidation; fatty acid transport	Peroxisome; integral component of peroxisomal membrane
Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Q6AY30	Sccpdh	47514	Oxidoreductase activity	Glycolipid biosynthetic process	Mitochondrion;; plasma membrane; lipid droplet
Alpha-L-fucosidase	A0A0G2JSJ8	Fuca1	53723	Alpha-L-fucosidase activity	Fucose metabolic process; glycoside catabolic process	--
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Q6P6R2	Dld	54574	dihydrolipoyl dehydrogenase activity; electron transfer activity; flavin adenine dinucleotide binding; lipoamide binding; NAD binding; pyruvate dehydrogenase (NAD+) activity	2-oxoglutarate metabolic process; acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; aging; cell redox homeostasis; dihydrolipoamide metabolic; gastrulation; histone succinylation; lipoate metabolic process; mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone; proteolysis; regulation of membrane potential; sperm capacitation	Mitochondrion; mitochondrial matrix; mitochondrion;nucleus; nucleoplasm; nucleus; acrosomal matrix; motile cilium; oxoglutarate dehydrogenase complex; pyruvate dehydrogenase complex
5'-nucleotidase, cytosolic IB	A0A0G2JX78	Nt5c1b	72661	5'-nucleotidase activity; magnesium ion binding; nucleotide binding	Adenosine metabolic process; nucleotide metabolic process	Cytosol
Solute carrier family 2 (Facilitated glucose transporter), member 3	A0A0G2JSJ3	Slc2a3	53984	Glucose transmembrane transporter activity	--	Integral component of membrane
14-3-3 protein zeta/delta	A0A0G2JV65	Ywhaz	29141	Protein domain specific binding	Protein targeting; regulation of cell death; synaptic target recognition	Nucleus; hippocampal mossy fiber to CA3 synapse

NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	B2RYS8	Ndufb8	22058	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	Mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	Mitochondrion; mitochondrion inner membrane
Fatty acid-binding protein 9	P55054	Fabp9	15308	Lipid binding	Acrosome assembly	Acrosomal vesicle
Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	Park7	30	20190	Androgen receptor binding; copper ion binding; cupric ion binding; cuprous ion binding; cytokine binding; L-dopa decarboxylase activator activity; mercury ion binding; mRNA binding; peptidase activity; protein deglycase activity; protein homodimerization activity; repressing transcription factor binding; scaffold protein binding; signaling receptor binding; small protein activating enzyme binding; superoxide dismutase copper chaperone activity; transcription coactivator activity; transcription factor binding; tyrosine 3-monooxygenase activator activity; ubiquitin-like protein conjugating enzyme binding	Aging; autophagy; cellular response to glyoxal; cellular response to hydrogen peroxide; cellular response to lipopolysaccharide; cellular response to oxidative stress; detoxification of copper ion; detoxification of mercury ion; DNA repair; fertilization; glucose homeostasis; glycolate biosynthetic process; guanine deglycation; guanine deglycation, glyoxal removal; guanine deglycation, methylglyoxal removal; hydrogen peroxide metabolic process; inflammatory response; insulin secretion; maternal process involved in female pregnancy; mitochondrion organization; negative regulation of cell death; negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway; negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway; negative regulation of neuron apoptotic process; negative regulation of neuron death; negative regulation of NMDA glutamate receptor activity; negative regulation of oxidative stress-induced neuron intrinsic apoptotic signaling pathway; negative regulation of protein acetylation; negative regulation of protein binding; negative regulation of protein export from nucleus; negative regulation of protein K48-linked deubiquitination; negative regulation of protein kinase activity; negative regulation of protein phosphorylation; negative regulation of protein sumoylation; negative regulation of protein ubiquitination; negative regulation of reactive oxygen species biosynthetic process; negative regulation of TRAIL-activated apoptotic signaling pathway; negative regulation of ubiquitin-specific protease activity; positive regulation of	Cytosol; extracellular region or secreted; extracellular exosome; mitochondrion; nucleus; PMLbody; plasma membrane; axón; cytoplasm; membrane raft; sperm head

						acute inflammatory response to antigenic stimulus; positive regulation of androgen receptor activity; positive regulation of dopamine biosynthetic process; positive regulation of fertilization; positive regulation of interleukin-8 production; positive regulation of L-dopa biosynthetic process; positive regulation of L-dopa decarboxylase activity; positive regulation of mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone; positive regulation of NAD(P)H oxidase activity; positive regulation of oxidative phosphorylation uncoupler activity; positive regulation of protein homodimerization activity; positive regulation of protein localization to nucleus; positive regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase activity; positive regulation of superoxide dismutase activity; positive regulation of transcription by RNA polymerase II; positive regulation of tyrosine 3-monooxygenase activity; protein deglycation, glyoxal removal; protein deglycosylation; protein stabilization; regulation of androgen receptor signaling pathway; regulation of inflammatory response; regulation of mitochondrial membrane potential; regulation of neuron apoptotic process; response to drug; response to oxidative stress; single fertilization; spermatogenesis	
LSM12 homolog	D4A8G0	Lsm12	21972	--		RNA metabolic process	--
Protein polyglycyclase TTLL10	A0A0G2JX96	Ttl10	86167	--		Cellular protein modification process	--
Similar to RIKEN cDNA 4930540L03 (Predicted)	D3Z9F9	Spaca1	37939	--		Acrosome assembly	Acrosomal membrane; integral component of membrane
Hyaluronidase PH-20	Q62803	Spam1	59059		Hyaluronoglucosaminidase activity	Carbohydrate metabolic process; cell adhesion; fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization	Plasma membrane; anchored component of membrane
Adenylate cyclase	G3V9G1	Adcy5	140898		Adenylate cyclase activity; adenylate cyclase binding; ATP binding; metal ion binding; protein heterodimerization activity; scaffold protein binding	Adenosine receptor signaling pathway; adenylate cyclase-activating dopamine receptor signaling pathway; adenylate cyclase-inhibiting dopamine receptor signaling pathway; cAMP biosynthetic	Cytoskeleton; intermediate filament cytoskeleton; plasma membrane; cilium; integral component of membrane

					process; cellular response to forskolin; locomotory behavior; neuromuscular process controlling balance; positive regulation of cytosolic calcium ion concentration; regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus	
Tubulin alpha-1A chain	P68370	Tuba1a	50788	GTPase activity; GTP binding; protein domain specific binding; protein heterodimerization activity; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based; microtubule cytoskeleton organization; mitotic cell cycle; regulation of synapse organization	Cytoskeleton; cytoplasmic microtubule; microtubule; endosome; recycling endosome; cytoplasm; cytoplasmic ribonucleoprotein granule; membrane raft; myelin sheath; neuromuscular junction
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	A0A0G2KAM3	Pdhb	46619	Pyruvate dehydrogenase (NAD+) activity	Tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion; nucleus; nucleoplasm; pyruvate dehydrogenase complex
L-lactate dehydrogenase	Q6AYX2	Ldhc	36089	L-lactate dehydrogenase activity	ATP biosynthetic process; carbohydrate metabolic process; flagellated sperm motility; lactate biosynthetic process from pyruvate; lactate oxidation	Cytoplasm; motile cilium
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P15999	Atp5f1a	59831	ADP binding; ATP binding; protease binding; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Aging; apoptotic process; ATP biosynthetic process; ATP metabolic process; ATP synthesis coupled proton transport; cellular response to dexamethasone stimulus; cellular response to nitric oxide; electron transport chain; response to ethanol; response to muscle activity; response to oxidative stress	Mitochondrion; inner membrane; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1); nucleus; plasma membrane; cell surface; membrane raft
Acrosin	A0A0G2K321	Acr	48876	Serine-type endopeptidase activity	--	Acrosomal vesicle
Epididymal-specific lipocalin-5	P06911	Lcn5	20828	Small molecule binding	--	Extracellular region or secreted
Carnitine O-acetyltransferase	A0A0H2UI21	Crat	71424	Carnitine O-acetyltransferase activity; signaling receptor binding	Carnitine metabolic process, CoA-linked	Mitochondrion; peroxisome
Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	A0A0H2UHE1	Sucg1	37935	Cofactor binding; nucleotide binding; succinate-CoA ligase (ADP-forming) activity; succinate-CoA ligase (GDP-forming) activity	Tricarboxylic acid cycle	Cytosol; mitochondrion; plasma membrane
CD177 antigen-like	M0R4W1	LOC100909620	27029	--	--	--
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	P19234	Ndufv2	27703	2 iron, 2 sulfur cluster binding; metal ion binding; NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	Cardiac muscle tissue development; mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone; nervous system development	Mitochondrion; mitochondrial respiratory chain complex I
Ras-related protein Rab-2A	F1LP82	Rab2a	22961	GDP binding; GTPase activity; GTP binding	Golgi organization	Golgi apparatus

Cytochrome c oxidase subunit 2	P00406	Mtco2	26082	Copper ion binding; cytochrome-c oxidase activity	ATP synthesis coupled electron transport; lactation; positive regulation of ATP biosynthetic process; positive regulation of hydrogen peroxide biosynthetic process; positive regulation of necrotic cell death; response to cold	Mitochondrion; mitochondrial inner membrane; integral component of membrane; respiratory chain complex IV
Serum albumin	A0A0G2JSH5	Alb	70710	Chaperone binding; DNA binding; exogenous protein binding; fatty acid binding; identical protein binding; metal ion binding; oxygen binding; pyridoxal phosphate binding; toxic substance binding	Cellular response to starvation; maintenance of mitochondrion location; negative regulation of apoptotic process; negative regulation of protein oligomerization	Endoplasmic reticulum; extracellular region or secreted; extracellular exosome; golgi apparatus; protein-containing complex
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P63039	Hspd1	61088	ATP binding; hydrolase activity; insulin binding; lipopolysaccharide binding; modification-dependent protein binding; protease binding; protein-containing complex binding; protein heterodimerization activity; unfolded protein binding	'de novo' protein folding; apoptotic mitochondrial changes; cellular response to heat; cellular response to interleukin-7; mitochondrion organization; negative regulation of apoptotic process; negative regulation of apoptotic process in bone marrow cell; negative regulation of neuron apoptotic process; negative regulation of reactive oxygen species biosynthetic process; positive regulation of inflammatory response; positive regulation of interferon-alpha production; positive regulation of interferon-gamma production; positive regulation of interleukin-6 secretion; positive regulation of T cell activation; positive regulation of tumor necrosis factor secretion; protein import into mitochondrial intermembrane space; protein refolding; response to activity; response to ATP; response to cocaine; response to cold; response to drug; response to estrogen; response to glucocorticoid; response to heat; response to hydrogen peroxide; response to hypoxia; response to ischemia; response to lipopolysaccharide; response to organic cyclic compound; response to organic substance; T cell activation	Cytosol; endoplasmic reticulum; rough endoplasmic reticulum; extracellular region or secreted; golgi apparatus; mitochondrion crista; mitochondrial inner membrane; mitochondrial matrix; peroxisome; peroxisomal matrix; plasma membrane; cell surface; cytoplasm; membrane raft; protein-containing complex; secretory granule; zymogen granule
Dynein light chain 2, cytoplasmic	Q78P75	Dynll2	10457	Dynein intermediate chain binding; dynein light intermediate chain binding; motor activity; protein heterodimerization activity; protein homodimerization activity; scaffold protein binding	microtubule-based process; positive regulation of ATP-dependent microtubule motor activity, plus-end-directed	Cytoskeleton; centrosome; cytoplasmic dynein complex; dynein complex; microtubule; myosin V complex; cytoplasm; glutamatergic synapse; postsynaptic density

Uncharacterized protein	F1MAE5	Prp211	101561	--	--	Integral component of membrane
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	P08461	Dlat	67637	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase activity; identical protein binding; nucleotide binding; pyruvate dehydrogenase (NAD+) activity	Acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; glucose metabolic process; sleep; tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion; mitochondrial matrix; pyruvate dehydrogenase complex
Lysozyme c	F1M6E7	Spaca3	18862	Lysozyme activity	Defense response to Gram-negative bacterium; defense response to Gram- positive bacterium; fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization	Acrosomal matrix; acrosomal membrane
Heat shock 70 kDa protein 1-like	P55063	Hspa11	70904	ATPase activity; ATPase activity, coupled; ATP 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; protein refolding; response to unfolded protein	Cytosol; mitochondrial matrix; mitochondrion; cytoplasm
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P07632	Sod1	16073	Chaperone binding; copper ion binding; enzyme binding; identical protein binding; protein phosphatase 2B binding; Rac GTPase binding; superoxide dismutase activity; superoxide dismutase copper chaperone activity; zinc ion binding	Activation of MAPK activity; anterograde axonal transport; auditory receptor cell stereocilium organization; cell aging; cellular iron ion homeostasis; cellular response to ATP; cellular response to cadmium ion; cellular response to oxidative stress; cellular response to potassium ion; embryo implantation; glutathione metabolic process; heart contraction; hydrogen peroxide biosynthetic process; locomotory behavior; muscle cell cellular homeostasis; myeloid cell homeostasis; negative regulation of apoptotic process; negative regulation of cholesterol biosynthetic process; negative regulation of inflammatory response; negative regulation of neuron apoptotic process; neurofilament cytoskeleton organization; ovarian follicle development; peripheral nervous system myelin maintenance; positive regulation of catalytic activity; positive regulation of cytokine production; positive regulation of oxidative stress- induced intrinsic apoptotic signaling pathway; positive regulation of phagocytosis; positive regulation of superoxide anion generation; reactive oxygen species metabolic process; regulation of blood pressure; regulation of	Cytosol; extracellular region or secreted; extracellular space; lysosome; mitochondrion; mitochondrial intermembrane space; nucleus; nucleoplasm; peroxisome; plasma membrane; axon cytoplasm; cytoplasm; cytoplasmic vesicle; dendrite; dense core granule; neuron projection; neuronal cell body; protein-containing complex; secretory granule

					GTPase activity; regulation of mitochondrial membrane potential; regulation of multicellular organism growth; regulation of protein kinase activity; relaxation of vascular smooth muscle; removal of superoxide radicals; response to amphetamine; response to antibiotic; response to antipsychotic drug; response to axon injury; response to carbon monoxide; response to copper ion; response to drug; response to ethanol; response to heat; response to hydrogen peroxide; response to nutrient levels; response to organic substance; response to oxidative stress; response to superoxide; retina homeostasis; retrograde axonal transport; sensory perception of sound; spermatogenesis; superoxide anion generation; superoxide metabolic process; transmission of nerve impulse	
Inositol-1-monophosphatase	F1M978	Impa1	30818	Inositol monophosphate 1-phosphatase activity; inositol monophosphate 3-phosphatase activity; inositol monophosphate 4-phosphatase activity; lithium ion binding; magnesium ion binding; manganese ion binding; protein homodimerization activity	Inositol biosynthetic process; inositol phosphate dephosphorylation; phosphatidylinositol biosynthetic; phosphatidylinositol phosphorylation; signal transduction	Cytoplasm
Cytochrome c oxidase subunit 6B2	Q6YFQ1	Cox6b2	10693	--	--	Mitochondrion; mitochondrial crista
RCG44470	D3ZVR6	Slf1	122988	Protein-containing complex binding; ubiquitin protein ligase binding	Cellular response to DNA damage stimulus; positive regulation of double-strand break repair; positive regulation of maintenance of mitotic sister chromatid cohesion; positive regulation of protein complex assembly; protein localization to site of double-strand break	Cytoskeleton; centrosome; nucleus; nuclear inclusion body; cytoplasm; nucleosome; site of double-strand break
Tubulin beta chain	G3V7C6	Tubb4b	61832	Double-stranded RNA binding; GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoskeleton; microtubule; cytoplasm
Tubulin alpha-8 chain	Q6AY56	Tuba8	50690	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization; mitotic cell cycle S	Cytoskeleton; microtubule; cytoplasm
Carnitine O-acetyltransferase	Q704S8	Crat	71211	Carnitine O-acetyltransferase activity	Carnitine metabolic process, CoA-linked; fatty acid metabolic process	Endoplasmic reticulum; mitochondrial inner membrane; mitochondrion; peroxisome

Phosphoglycerate kinase	Q5XIV1	Pgk2	45380	ADP binding; ATP binding; phosphoglycerate kinase activity	flagellated sperm motility; gluconeogenesis; glycolytic process; positive regulation of oxidative phosphorylation	Cytosol; sperm fibrous sheath
Hexokinase-1	P05708	Hk1	103540	ATPase activity; ATP binding; fructokinase activity; glucokinase activity; glucose binding; hexokinase activity; mannokinase activity; protein-containing complex binding; protein homodimerization activity; protein kinase activity	Carbohydrate phosphorylation; cellular glucose homeostasis; glycolytic process; hexose metabolic process; negative regulation of apoptotic process; peptidyl-serine phosphorylation; peptidyl-threonine phosphorylation; peptidyl-tyrosine phosphorylation; protein autophosphorylation; protein phosphorylation; regulation of anion channel activity; response to brassinosteroid; response to hypoxia; response to ischemia; response to ketamine	Cytosol; mitochondrial outer membrane; mitochondrion; plasma membrane; caveola; protein-containing complex
Globin c2	A0A0G2JSV6	Hba-a2	15446	Heme binding; iron ion binding; organic acid binding; oxygen binding; oxygen carrier activity	Cellular oxidant detoxification; hydrogen peroxide catabolic process; protein heterooligomerization; response to estradiol	Cytosol; hemoglobin complex; haptoglobin-hemoglobin complex
Izumo sperm-egg fusion protein 1	Q6AY06	Izumo1	44235	Protein binding involved in heterotypic cell-cell adhesion; protein homodimerization activity; signaling receptor binding	Fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization; heterotypic cell-cell adhesion; single fertilization; sperm-egg recognition	Plasma membrane; acrosomal membrane; integral component of membrane
Keratin, type II cytoskeletal 73	A0A0G2JXH6	Krt73	59372	--	--	Cytoskeleton; keratin filament
Fibrous sheath CABYR-binding protein	Q4V7A4	Fscb	88110	--	Negative regulation of protein sumoylation	Motile cilium
Fructose-bisphosphate aldolase A	P05065	Aldoa	39783	Fructose-bisphosphate aldolase activity	Glycolytic; methylglyoxal biosynthetic process; protein homotetramerization; response to estrogen; response to heat; response to hypoxia; response to lipopolysaccharide; response to nicotine	Mitochondrion; nucleus; nuclear heterochromatin; cytoplasm; I band; M band
Equatorin	Q2LCV6	Eqtn	31483	--	Acrosomal vesicle exocytosis; endocytosis; fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization	Plasma membrane; acrosomal membrane; inner acrosomal membrane; integral component of membrane; outer acrosomal membrane
Translation initiation factor eIF-2B subunit beta	F7EVX2	Eif2b2	42192	ATP binding; GTP binding; guanyl-nucleotide exchange factor activity; translation initiation factor activity	Myelination; oligodendrocyte development; ovarian follicle development; T cell receptor signaling pathway	Eukaryotic translation initiation factor 2B complex
Tensin 3	F1LN91	Tns3	166629	Metal ion binding	Cell migration; intracellular signal transduction; lung alveolus development; positive regulation of cell population proliferation	Cytosol; ocal adhesion

Outer dense fiber protein 2	Q6AYX5-5	Odf2	72069	--	Centriole-centriole cohesion; cilium organization; multicellular organism; protein localization; spermatid development	Cytoskeleton; centriole; centrosome; microtubule; outer dense fiber; spindle pole; centriolar subdistal appendage; ciliary transition fiber
Fc fragment of IgG-binding protein	D3ZJF8	Fcgbp	287411	--	--	Extracellular region or secreted
Hemoglobin subunit beta-2	P11517	N/A	16086	Heme binding; hemoglobin alpha binding; metal ion binding; organic acid binding; oxygen binding; oxygen carrier activity	Cellular oxidant detoxificationhydrogen peroxide catabolic process; protein heterooligomerization	Cytosol; hemoglobin complex
Arylsulfatase A	Q32KK2	Arsa	54496	Arylsulfatase activity; cerebroside-sulfatase activity	Autophagy; binding of sperm to zona pellucida; central nervous system development; response to estrogen; response to ethanol; response to methylmercury; response to nutrient; response to pH	Endosome; extracellular region or secreted; lysosome; plasma membrane; extrinsic component of external side of plasma membrane; acrosomal vesicle; cytoplasm; integral component of membrane
ATP synthase subunit O, mitochondrial	Q06647	Atp5po	23440	Protein-containing complex binding; proton-transporting; ATP synthase activity, rotational mechanism; steroid binding	ATP metabolic process; ATP synthesis coupled proton transport	Mitochondrion; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)
Tektin-2	Q6AYM2	Tekt2	50721	--	Cilium assembly; cilium movement involved in cell motility; flagellated sperm motility; inner dynein arm assembly	Cytoskeleton; microtubule; microtubule organizing center; cytoplasm; sperm flagellum
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	A0A0G2JTG1	Hspe1	9382	ATP binding	Protein folding	Cytoplasm
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	B2RYS2	Uqcrb	13550	Protein-containing complex binding	Aerobic respiration; mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c; mitochondrial respiratory chain complex III assembly; protein heterooligomerization	Mitochondrion; mitochondrial respiratory chain complex III
Serine/threonine-protein phosphatase	A0A0G2JVK2	Ppp1cc	38420	Metal ion binding; protein serine/threonine phosphatase activity	--	Protein phosphatase type 1 complex
Nuclear receptor interacting protein 3 (Predicted), isoform CRA_a	D4A2K5	Nrip3	27221	Aspartic-type endopeptidase activity	--	--
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	P19511	Atp5pb	28965	Protein-containing complex binding; proton transmembrane transporter activity	ATP hydrolysis coupled cation transmembrane transport; ATP metabolic process; ATP synthesis coupled proton transport; cellular response to hypoxia	Mitochondrion; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)
Uncharacterized protein	F1LZC5	N/A	16819	--	--	--
Vomer nasal type-2 receptor 116-like	A0A0G2JVY7	LOC108348133	99334	G protein-coupled receptor activity	--	Plasma membrane; integral component of membrane
RCG22622	M0RAK2	LOC684270	23199	Catalytic activity	--	Cytoplasm
Tubulin beta chain	Q4QQV0	Tubb6	50483	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization; mitotic cell cycle	Cytoskeleton; microtubule; cytoplasm

Outer dense fiber of sperm tails 2, isoform CRA_e	G3V7X0	Odf2	82322	--	--	--
Uncharacterized protein	M0R5J4	N/A	47444	Magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity	Glycolytic process	Cytosol
ATP synthase subunit alpha	F1LP05	Atp5f1a	59890	ATP binding; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP synthesis coupled proton transport; lipid metabolic process	Mitochondrion; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	B1WBQ8	Gapdhs	47376	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity; NAD binding; NADP binding	glucose metabolic process; glycolytic process	--
Glutathione peroxidase	A0A0G2K398	Gpx4	22687	Glutathione peroxidase activity	Response to oxidative stress	--
E3 ubiquitin-protein ligase RNF181	Q6AXU4	Rnf181	19674	Metal ion binding; ubiquitin protein ligase activity	Protein autoubiquitination; protein ubiquitination	--
Adenylate kinase isoenzyme 1	P39069	Ak1	21684	Adenylate kinase activity; ATP binding; nucleoside diphosphate kinase activity	Adenine metabolic process; ADP biosynthetic process; AMP metabolic process; cerebellum development; inosine biosynthetic process; muscle organ development; neuron differentiation; nucleoside diphosphate phosphorylation; nucleoside triphosphate biosynthetic process; olfactory bulb development; positive regulation of glucose transmembrane transport; positive regulation of neuron maturation; response to activity; response to drug; response to estradiol; response to testosterone	Neuron projection; perinuclear region of cytoplasm; sarcomere
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	G3V7N5	Cpt2	74602	Transferase activity, transferring acyl groups	Positive regulation of cold-induced thermogenesis	Mitochondrion; nucleolus; nucleoplasm
Adenylate kinase 2, mitochondrial	A0A0G2JSG6	Ak2	25741	Adenylate kinase activity; ATP binding	ADP biosynthetic process; AMP metabolic process; ATP metabolic process	Mitochondrial intermembrane space; sperm mitochondrial sheath
Uncharacterized protein	D3ZE63	N/A	12768	--	--	--
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	B0K020	Cisd1	12260	2 iron, 2 sulfur cluster binding; identical protein binding ; metal ion binding	Regulation of cellular respiration	Mitochondrion; cytoplasmic side of mitochondrial outer membrane; integral component of membrane
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	P29266	Hibadh	35679	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase activity; NAD binding; NADP binding; oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	Valine catabolic process	Mitochondrion

Axonemal dynein light intermediate polypeptide 1	Q4FZV3	Dnali1	29889	Dynein heavy chain binding; motor activity	Inner dynein arm assembly	Cytoskeleton; axoneme; dynein complex; 9+2 motile cilium; cytoplasm; filopodium
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	P21571	Atp5pf	12487	ATPase activity; protein-containing complex binding; proton transmembrane transporter activity	ATP metabolic process; ATP synthesis coupled proton transport; negative regulation of arachidonic acid secretion; negative regulation of prostaglandin secretion; positive regulation of blood pressure; positive regulation of heart rate; response to muscle activity	Extracellular region or secreted extracellular space; mitochondrion; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o); cell surface
Tripartite motif-containing 33	D3ZUK4	Trim33	126232	co-SMAD binding; R-SMAD binding; zinc ion binding	Negative regulation of BMP signaling pathway; protein ubiquitination; regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	Nucleus
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	P12368	Prkar2a	45794	3',5'-cyclic-GMP phosphodiesterase activity; beta-2 adrenergic receptor binding; cAMP binding; cAMP-dependent protein kinase regulator activity; protein domain specific binding; protein homodimerization activity; protein kinase A catalytic subunit binding; small molecule binding	cGMP-mediated signaling; protein heterooligomerization; regulation of protein kinase activity; response to clozapine	Cytosol; plasma membrane T-tubule Source; cAMP-dependent protein kinase complex; cytoplasm; perinuclear region of cytoplasm; protein-containing complex
Histone H2A	M0RCL5	LOC100910554	14144	DNA binding; protein heterodimerization activity	Chromatin organization	Nucleus; nuclear chromatin; nucleosome
Syntaxin-12	A0A0G2JVB6	Stx12	32520	SNAP receptor activity	Autophagosome assembly; cholesterol efflux; intracellular protein transport; protein stabilization; vesicle-mediated transport	Cytosol; BLOC-1 complex; membrane raft; phagocytic vesicle; phagophore assembly site; SNARE complex
Signal-regulatory protein beta 3	A0A0G2JTD2	Sirpb3	55307	--	--	Plasma membrane
Hexokinase-1	M0RAQ6	Hk1	100919	ATP binding; glucose binding; hexokinase activity; identical protein binding; peptidoglycan binding	Cellular glucose homeostasis; establishment of protein localization to mitochondrion; glycolytic process; maintenance of protein location in mitochondrion; positive regulation of cytokine secretion involved in immune response; positive regulation of interleukin-1 beta secretion	Cytosol; mitochondrion; membrane raft
Beta-globin	A0A0G2JTW9	Hbb-b1	16092	Heme binding; metal ion binding; oxygen binding; oxygen carrier activity	--	Cytosol; hemoglobin complex
Nuclear pore complex protein Nup85	Q4QQS8	Nup85	75916	Structural constituent of nuclear pore	Lamellipodium assembly; macrophage chemotaxis; mRNA export from nucleus; positive regulation of transcription, DNA-templated; protein import into nucleus	Cytoskeleton; spindle; cytosol; nucleus; nuclear membrane; nuclear pore outer ring; condensed chromosome kinetochore
Heat shock 70 kDa protein 1A	P0DMW0	Hspa1a	70427	ATPase activity; ATPase activity, coupled; ATP binding; heat shock protein	Cellular response to heat; cellular response to unfolded protein; chaperone	Cytoskeleton; centrosome; cytosol; nucleus; nuclear speck; nucleus;

				binding; misfolded protein binding; protein folding chaperone; transcription corepressor activity; ubiquitin protein ligase binding; unfolded protein binding	cofactor-dependent protein refolding; mRNA catabolic process; negative regulation of cell death; negative regulation of cell growth; negative regulation of cell population proliferation; negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to stress; neuron differentiation; positive regulation of microtubule nucleation; positive regulation of neuron differentiation; positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; protein refolding; regulation of mitotic spindle assembly; response to ethanol; response to ischemia; response to mechanical stimulus; response to radiation; response to unfolded protein	cytoplasm; membrane raft; perinuclear region of cytoplasm; protein-containing complex
Uncharacterized protein	A0A0G2JUG1	N/A	57880	Structural molecule activity	--	Cytoskeleton; keratin filament
Kazrin	Q5FWS6-2	Kazn	37197	--	Keratinization	Cytoskeleton; nucleus; cell junction; cytoplasm
Septin-9	F1LN75	Sept9	64102	GTP binding	Positive regulation of non-motile cilium assembly; protein heterooligomerization	Cytoskeleton; axoneme; microtubule ; septin complex; stress fiber; non-motile cilium; perinuclear region of cytoplasm
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	P18163	Acsl1	79155	Acetate-CoA ligase activity; ATP binding; decanoate-CoA ligase activity; long-chain fatty acid-CoA ligase activity	Adiponectin-activated signaling pathway; fatty acid metabolic process; fatty acid transport; lipid metabolic process; long-chain fatty acid import into cell; long-chain fatty-acyl-CoA biosynthetic process; positive regulation of cold-induced thermogenesis; positive regulation of protein serine/threonine kinase activity; response to drug; response to nutrient; response to oleic acid; response to organic cyclic compound; response to organic substance; triglyceride biosynthetic process; xenobiotic catabolic process	Endoplasmic reticulum; reticulum membrane; mitochondrion; mitochondrial outer membrane; peroxisome; peroxisomal membrane; plasma membrane; integral component of membrane
A-kinase anchor protein 4	O35774	Akap4	94916	Protein kinase A binding	Cell projection organization; flagellated sperm motility	--
Similar to chromosome 14 open reading frame 8 (Predicted)	D3ZCE7	Tppp2	18641	Tubulin binding	Microtubule bundle formation; microtubule polymerization; positive regulation of protein polymerization	Cytosol
Clusterin	A0A0G2KB42	Clu	34723	--	--	--
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha	A0A0G2K405	Prkar2a	48457	cAMP binding; cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity; cAMP-	Negative regulation of cAMP-dependent protein kinase activity	Axoneme; centrosome; plasma membrane raft; cAMP-dependent

regulatory subunit				dependent protein kinase regulator activity; protein domain specific binding; protein kinase A catalytic subunit binding; ubiquitin protein ligase binding		protein kinase complex; nucleotide-activated protein kinase complex
Type II keratin Kb15	A0A0G2JVA8	Kb15	58459	Structural molecule activity	--	Cytoskeleton; keratin filament
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P46462	Vcp	89977	ADP binding; ATPase activity; ATP binding; BAT3 complex binding; deubiquitinase activator activity; identical protein binding; K48-linked polyubiquitin modification-dependent protein binding; lipid binding; MHC class I protein binding; polyubiquitin modification-dependent protein binding; protein-containing complex binding; protein domain specific binding; protein phosphatase binding; signaling receptor binding; ubiquitin protein ligase binding; ubiquitin-specific protease binding	Activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process; aggresome assembly; ATP metabolic process; autophagosome maturation; autophagy; cellular response to arsenite ion; cellular response to DNA damage stimulus; cellular response to heat; double-strand break repair; endoplasmic reticulum stress-induced pre-emptive quality control; endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport; endosome to lysosome transport via multivesicular body sorting pathway; ERAD pathway; ER-associated misfolded protein catabolic process; flavin adenine dinucleotide catabolic process; macroautophagy; mitotic spindle disassembly; NADH metabolic process; positive regulation of ATP biosynthetic process; positive regulation of canonical Wnt signaling pathway; positive regulation of Lys63-specific deubiquitinase activity; positive regulation of mitochondrial membrane potential; positive regulation of oxidative phosphorylation; positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; positive regulation of protein complex assembly; proteasomal protein catabolic process; proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process; protein hexamerization; protein homooligomerization; protein N-linked glycosylation via asparagine; protein ubiquitination; regulation of aerobic respiration; regulation of synapse organization; retrograde protein transport, ER to cytosol; stress granule disassembly; translesion synthesis; ubiquitin-dependent ERAD pathway; viral genome replication	Cytosol; endoplasmic reticulum; derlin-1 retrotranslocation complex; endoplasmic; VCP-NPL4-UFD1 AAA ATPase complex; nucleus; nucleoplasm; ATPase complex; cytoplasm; cytoplasmic stress granule; glutamatergic synapse; intracellular membrane-bounded organelle; lipid droplet; perinuclear region of cytoplasm; proteasome complex; site of double-strand break; VCP-NSFL1C complex

Aspartyl aminopeptidase	Q4V8H5	Dnpep	53092	Metalloaminopeptidase activity; zinc ion binding	--	Cytosol; extracellular region or secreted; cytoplasm
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P62982	Rps27a	18282	Metal ion binding; protein tag; structural constituent of ribosome; ubiquitin protein ligase binding	Modification-dependent protein catabolic process; protein ubiquitination; translation	Cytosol; cytosolic small ribosomal subunit; nucleus; cytoplasm
Glucose-6-phosphate isomerase	Q6P6V0	Gpi	62958	Cytokine activity; glucose-6-phosphate isomerase activity; growth factor activity; intramolecular transferase activity; monosaccharide binding; ubiquitin protein ligase binding	Aldehyde catabolic process; carbohydrate metabolic process; erythrocyte homeostasis; gluconeogenesis; glucose 6-phosphate metabolic process; glucose homeostasis; glycolytic process; in utero embryonic development; learning or memory; mesoderm formation; methylglyoxal biosynthetic process; negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process; negative regulation of neuron apoptotic process; positive regulation of endothelial cell migration; positive regulation of immunoglobulin secretion; response to cadmium ion; response to estradiol; response to immobilization stress; response to morphine; response to muscle stretch; response to progesterone; response to testosterone	Cytosol; extracellular region or secreted; extracellular space; nucleus; nucleoplasm; plasma membrane; ciliary membrane; cytoplasm; neuron projection
RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein	A0A0G2K7M2	Rad23a	39571	Damaged DNA binding; kinase binding; polyubiquitin modification-dependent protein binding; proteasome binding; ubiquitin binding; ubiquitin-specific protease binding	Nucleotide-excision repair; positive regulation of cell cycle; positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; positive regulation of viral genome replication; proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process; protein destabilization	Cytoskeleton; microtubule organizing center; cytosol; nucleus; nucleoplasm; proteasome complex
DOP1 leucine zipper-like protein A	D4A0Y2	Dop1a	277245	--	Golgi to endosome transport	Cytosol; endosome; Golgi apparatus; trans-Golgi network
Jumonji domain-containing 7	D3ZZV5	Jmjd7	36219	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase activity	--	--
Coiled-coil domain-containing protein 63	F1LTP5	Ccdc63	65508	--	--	--
ERCC excision repair 6-like 2	D3ZPU4	Ercc6l2	175208	ATP binding	--	--
Radial spoke head 3 homolog	F1LRY1	Rsph3	61050	--	--	Cilium
Tektin-3	Q4V8G8	Tekt3	56894	--	Cilium assembly; cilium movement involved in cell motility; flagellated sperm motility; regulation of brood size	Acrosomal membrane; outer acrosomal membrane; sperm flagellum

Keratin 79	A0A0G2JW69	Krt79	53076	Enzyme binding; structural molecule activity	--	Cytoskeleton; keratin filament
RCG60210	B0BMZ4	Spatc1	50426	--	--	Cytoskeleton; centrosome
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Q68FY0	Uqcrc1	53500	Catalytic activity; metal ion binding; protein-containing complex binding; ubiquitin protein ligase binding	Mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c; response to activity; response to alkaloid	Cytosol; mitochondrion; mitochondrial inner membrane; mitochondrial respiratory chain complex III
Sperm mitochondrial-associated cysteine-rich protein	Q64298	Smcp	17075	--	Flagellated sperm motility; single fertilization	Mitochondrion; mitochondrial membrane; cytoplasm
Similar to testes development-related SP22 isoform 1	D4A9U1	RGD1561916	30834	Alpha-tubulin binding	Cellular protein-containing complex assembly	Cytoskeleton; manchette; nucleus; perinuclear region of cytoplasm
Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	G3V926	Chuk	85815	ATP binding; IkappaB kinase activity; protein heterodimerization activity; protein homodimerization activity; protein serine/threonine kinase activity; scaffold protein binding	Cellular response to cadmium ion; cellular response to reactive oxygen species; cellular response to virus; negative regulation of NF-kappaB transcription factor activity; NIK/NF-kappaB signaling; peptidyl-serine phosphorylation; positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling; positive regulation of interferon-alpha secretion; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; positive regulation of transcription by RNA polymerase II; response to acetate; response to amino acid; response to cholecystokinin; response to drug; response to hydroperoxide; response to lipopolysaccharide; response to organic substance; response to toxic substance; Rho protein signal transduction; skeletal muscle contraction; striated muscle cell differentiation; tumor necrosis factor-mediated signaling pathway	Cytosol; IkappaB kinase complex; nucleus; nucleoplasm; intracellular membrane-bounded organelle
Similar to BC049730 protein	M0R867	LOC102553892	21819	--	--	--
Solute carrier family 15 member 3	Q924V4	Slc15a3	65122	Oligopeptide transmembrane transporter activity; peptide:proton symporter activity; peptide transmembrane transporter activity; proton-dependent oligopeptide secondary active transmembrane transporter activity	Protein catabolic process; protein transport	Lysosome; lysosomal membrane; integral component of membrane
MICOS complex subunit MIC60	A0A0G2JVH4	Immt	86689	--	Ristae formation; mitochondrial calcium ion homeostasis	Mitochondrion; MICOS complex

Similar to EF hand calcium-binding domain 1	F1LX06	LOC500007	25504	Calcium ion binding	--	--
NME/NM23 family member 5	D3ZH90	Nme5	24205	Nucleoside diphosphate kinase activity	Cilium assembly; CTP biosynthetic process; epithelial cilium movement; GTP biosynthetic process; negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; spermatid development; UTP biosynthetic process; ventricular system development	Sperm flagellum
Sodium channel protein	F1LX08	Scn3a	223377	Voltage-gated ion channel activity; voltage-gated sodium channel activity	Regulation of ion transmembrane transport	Plasma membrane; voltage-gated sodium channel complex; cytoplasm
ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11	P70673	Kcnj11	43979	Ankyrin binding; ATP-activated inward rectifier potassium channel activity; ATP binding; heat shock protein binding; inward rectifier potassium channel activity; ion channel binding; protein C-terminus binding	Cellular response to glucose stimulus; cellular response to nicotine ; cellular response to tumor necrosis factor; glucose metabolic process; negative regulation of insulin secretion ; nervous system process; positive regulation of cation channel activity; positive regulation of protein localization to plasma membrane; potassium ion import across plasma membrane; potassium ion transport; regulation of membrane potential; response to ATP; response to drug; response to estradiol; response to ischemia; response to testosterone	Cytosol; endoplasmic reticulum; endosome; mitochondrion; nucleus; nuclear envelope; plasma membrane axolemma; inward rectifying potassium channel; plasma membrane; sarcolemma; T-tubule; acrosomal; cell body fiber; intercalated disc; intracellular membrane-bounded organelle; myelin sheath; neuronal cell body
Clusterin	G3V836	Clu	52015	Amyloid-beta binding; low-density lipoprotein particle receptor binding; misfolded protein binding; protein-containing complex binding; tau protein binding; ubiquitin protein ligase binding	Cell morphogenesis; central nervous system myelin maintenance; chaperone-mediated protein complex assembly; chaperone-mediated protein foldin; microglial cell activation; microglial cell proliferation; negative regulation of amyloid-beta formation; negative regulation of amyloid fibril formation; negative regulation of cellular response to thapsigargin; negative regulation of cellular response to tunicamycin; negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage; negative regulation of protein homooligomerization; negative regulation of response to endoplasmic reticulum stress; positive regulation of amyloid-beta formation; positive regulation of apoptotic process; positive regulation of neurofibrillary tangle assembly; positive regulation of neuron death; positive	Cytoskeleton; cytosol; endoplasmic reticulum; perinuclear endoplasmic reticulum lumen; extracellular region or secreted; spherical high-density lipoprotein particle; mitochondrion; mitochondrial inner membrane; nucleus; apical dendrite; cell periphery; cell Surface; neurofibrillary tangle; synapse

					regulation of NF-kappaB transcription factor activity; positive regulation of nitric oxide biosynthetic process; positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; positive regulation of protein homooligomerization; positive regulation of receptor-mediated endocytosis; positive regulation of tau-protein kinase activity; positive regulation of tumor necrosis factor production; protein import; protein stabilization; regulation of amyloid-beta clearance; regulation of cell population proliferation; regulation of neuronal signal transduction; response to misfolded protein; response to virus	
NPC intracellular cholesterol transporter 2	F7FJQ3	Npc2	17137	Cholesterol binding; cholesterol transporter activity; enzyme binding	Cholesterol efflux; cholesterol homeostasis; intracellular cholesterol transport; response to virus	Extracellular region or secreted; extracellular space; lysosome
Heat shock-related 70 kDa protein 2	A0A0G2JUT0	Hspa2	66300	ATP binding	--	--
Cysteine-rich secretory protein 1	P12020	Crisp1	28741	--	--	Extracellular region or secreted; extracellular space; specific granule
Galactosidase, beta 1-like	B1WBS6	Glb1l	73443	Beta-galactosidase activity	Carbohydrate metabolic process	Vacuole
Transforming growth factor beta-1 proprotein	P17246	Tgfb1	44985	Antigen binding; cytokine activity; enzyme binding; growth factor activity; protein heterodimerization activity; protein homodimerization activity; protein N-terminus binding; protein serine/threonine kinase activator activity; transforming growth factor beta receptor binding; type III transforming growth factor beta receptor binding; type II transforming growth factor beta receptor binding; type I transforming growth factor beta receptor binding	Adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains; aging; animal organ regeneration; aortic valve morphogenesis; ATP biosynthetic process; branch elongation involved in mammary gland duct branching; cell-cell junction organization; cell cycle arrest; cell development; cell migration; cellular calcium ion homeostasis; cellular response to dexamethasone stimulus; cellular response to insulin-like growth factor stimulus; cellular response to ionizing radiation; cellular response to mechanical stimulus; cellular response to organic cyclic compound; cellular response to transforming growth factor beta stimulus; chondrocyte differentiation; common-partner SMAD protein phosphorylation; defense response to fungus, incompatible	Extracellular region or secreted; blood microparticle; collagen-containing extracellular matrix; extracellular space; nucleus; axon; cell surface; cytoplasm; microvillus; neuronal cell body; secretory granule

interaction; digestive tract development; embryonic liver development; endoderm development; epidermal growth factor receptor signaling pathway; epithelial to mesenchymal transition; evasion or tolerance of host defenses by virus; extracellular matrix assembly; extrinsic apoptotic signaling pathway; face morphogenesis; female pregnancy; frontal suture morphogenesis; germ cell migration; hematopoietic progenitor cell differentiation; hyaluronan catabolic process; inflammatory response; inner ear development; lens fiber cell differentiation; lipopolysaccharide-mediated signaling pathway; liver regeneration; lung development; lymph node development; mammary gland branching involved in thelarche; MAPK cascade; membrane protein intracellular domain proteolysis; mitotic cell cycle checkpoint; mononuclear cell proliferation; morphogenesis of a branching structure; myelination; myeloid dendritic cell differentiation; negative regulation of biomineral tissue development; negative regulation of blood vessel endothelial cell migration; negative regulation of cell-cell adhesion; negative regulation of cell cycle; negative regulation of cell growth; negative regulation of cell population proliferation; negative regulation of cytolysis; negative regulation of epithelial cell proliferation; negative regulation of fat cell differentiation; negative regulation of gene expression; negative regulation of hyaluronan biosynthetic process; negative regulation of immune response; negative regulation of interleukin-17 production; negative regulation of macrophage cytokine production; negative regulation of mitotic cell cycle; negative regulation of myoblast differentiation; negative regulation of neuroblast proliferation; negative regulation of ossification;

negative regulation of phagocytosis;
 negative regulation of production of
 miRNAs involved in gene silencing by
 miRNA; negative regulation of protein
 localization to plasma membrane;
 negative regulation of protein
 phosphorylation; negative regulation of
 release of sequestered calcium ion into
 cytosol; negative regulation of skeletal
 muscle tissue development; negative
 regulation of T cell proliferation; negative
 regulation of transcription, DNA-
 templated; negative regulation of
 transcription by RNA polymerase II;
 neural tube closure; Notch signaling
 pathway; oligodendrocyte development;
 ossification involved in bone remodeling;
 osteoclast differentiation; pathway-
 restricted SMAD protein phosphorylation;
 phosphate-containing compound
 metabolic process; positive regulation of
 apoptotic process; positive regulation of
 blood vessel endothelial cell migration;
 positive regulation of bone mineralization;
 positive regulation of branching involved
 in ureteric bud morphogenesis; positive
 regulation of cardiac muscle cell
 differentiation; positive regulation of cell
 cycle arrest; positive regulation of cell
 division; positive regulation of cell
 migration; positive regulation of cell
 population proliferation; positive
 regulation of cellular protein metabolic
 process; positive regulation of
 chemotaxis; positive regulation of
 collagen biosynthetic process; positive
 regulation of epithelial cell proliferation;
 positive regulation of epithelial to
 mesenchymal transition; positive
 regulation of ERK1 and ERK2 cascade;
 positive regulation of exit from mitosis;
 positive regulation of fibroblast migration;
 positive regulation of fibroblast
 proliferation; positive regulation of gene
 expression; positive regulation of histone
 acetylation; positive regulation of histone

deacetylation; positive regulation of interleukin-17 production; positive regulation of isotype switching to IgA isotypes; positive regulation of MAP kinase activity; positive regulation of microglia differentiation; positive regulation of mononuclear cell migration; positive regulation of NAD⁺ ADP-ribosyltransferase activity; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; positive regulation of odontogenesis; positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation; positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation; positive regulation of peptidyl-threonine phosphorylation; positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation; positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity; positive regulation of pri-miRNA transcription by RNA polymerase II; positive regulation of production of miRNAs involved in gene silencing by miRNA; positive regulation of protein complex assembly; positive regulation of protein dephosphorylation; positive regulation of protein import into nucleus; positive regulation of protein kinase B signaling; positive regulation of protein phosphorylation; positive regulation of protein secretion; positive regulation of receptor clustering; positive regulation of regulatory T cell differentiation; positive regulation of SMAD protein signal transduction; positive regulation of smooth muscle cell differentiation; positive regulation of superoxide anion generation; positive regulation of transcription, DNA-templated; positive regulation of transcription by RNA polymerase II; positive regulation of transcription regulatory region DNA binding; positive regulation of vascular permeability; protein export from nucleus; protein kinase B signaling; protein

					phosphorylation; receptor catabolic process; regulation of actin cytoskeleton reorganization; regulation of apoptotic process; regulation of branching involved in mammary gland duct morphogenesis; regulation of cartilage development; regulation of cell growth; regulation of cell population proliferation; regulation of interleukin-23 production; regulation of MAPK cascade; regulation of SMAD protein signal transduction; regulation of sodium ion transport; regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway; regulatory T cell differentiation; response to cholesterol; response to drug; response to estradiol; response to glucose; response to hypoxia; response to immobilization stress; response to laminar fluid shear stress; response to organic cyclic compound; response to organic substance; response to progesterone; response to radiation; response to salt; response to vitamin D; response to wounding; salivary gland morphogenesis; SMAD protein complex assembly; SMAD protein signal transduction; T cell homeostasis; tolerance induction to self antigen; transforming growth factor beta receptor signaling pathway; transforming growth factor beta receptor signaling pathway involved in heart development; ureteric bud development; vasculogenesis; ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis; wound healing	
Thymosin beta	A0A0G2K7A1	LOC100361139	5349	Actin monomer binding	Actin filament organization; regulation of cell migration; sequestering of actin monomers	Cytoskeleton; cytoplasm
Keratin, type II cytoskeletal 1	A0A0G2JST3	Krt1	65059	Carbohydrate binding; protein heterodimerization; structural constituent of epidermis	complement activation, lectin pathway; establishment of skin barrier; negative regulation of inflammatory response; peptide cross-linking; protein heterotetramerization	Cytoskeleton; keratin filament; plasma membrane; cornified envelope
A-kinase anchor protein 4	F1LMR8	Akap4	81825	Protein kinase A binding	Establishment of protein localization; flagellated sperm motility; motile cilium	Perinuclear region of cytoplasm; sperm fibrous sheath; sperm principal piece; Z disc

Glutathione S-transferase Mu 5	Q9Z1B2	Gstm5	27067	Glutathione transferase activity; protein homodimerization activity	assembly; transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway Glutathione metabolic process	Cytoplasm
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, testis-specific form, mitochondrial	Q06437	Pdha2	44049	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity; pyruvate dehydrogenase (NAD ⁺) activity	Acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; glucose metabolic process; pyruvate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion; nucleolus; pyruvate dehydrogenase complex
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	F1LNF7	Idh3a	41606	Isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺) activity; magnesium ion binding; NAD binding	Tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion
Collagen type XVIII alpha 1 chain	F1LR02	Col18a1	134905	Extracellular matrix structural constituent	Angiogenesis; endothelial cell morphogenesis; extracellular matrix organization; response to drug; response to hydrostatic pressure	Extracellular region or secreted; collagen type XVIII trimer; extracellular matrix; extracellular space
LOC683667 protein	B0BNJ1	Sri	21952	Calcium ion binding; protease binding; protein heterodimerization activity; repressing transcription factor binding	Calcium ion transport; cytoplasmic sequestering of transcription factor; heart development; negative regulation of cardiac muscle contraction; negative regulation of heart rate; negative regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity; negative regulation of transcription regulatory region DNA binding; positive regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus; positive regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol Source: Ensembl	Cytosol; endoplasmic reticulum; endoplasmic reticulum membrane; smooth endoplasmic reticulum; extracellular region or secreted; extracellular exosome; mitochondrion; nucleus; nucleoplasm; plasma membrane; T-tubule; axón; axon terminus; chromaffin granule membrane; dendritic spine neck; Z disc
Outer dense fiber of sperm tails 3	D3ZE94	Odf3	27975	--	--	Cytoskeleton; outer dense fiber
WD repeat domain 72	A0A0G2K3H7	Wdr72	105075	--	--	Cytoplasm
RNA-binding motif protein 39	Q5BJP4	Rbm39	58932	RNA binding	mRNA processing	Nucleus
Park7 protein	Q5BKC3	Park7	23002	Androgen receptor binding; cupric ion binding; cuprous ion binding; cytokine binding; kinase binding; L-dopa decarboxylase activator activity; mercury ion binding; mRNA binding; oxidoreductase activity, acting on	cellular response to glyoxal; cellular response to hydrogen peroxide; detoxification of copper ion; detoxification of mercury ion; DNA repair; glutathione deglycation; guanine deglycation, glyoxal removal; guanine	Cytosol; mitochondrion; mitochondrial respiratory chain complex I; nucleus; PML body; chromatin; perinuclear region of cytoplasm

peroxide as acceptor; peptidase activity; protein deglycase activity; protein homodimerization activity; repressing transcription factor binding; scaffold protein binding; small protein activating enzyme binding; superoxide dismutase copper chaperone activity; transcription coactivator activity; tyrosine 3-monooxygenase activator activity; ubiquitin-like protein conjugating enzyme binding; ubiquitin-specific protease binding; deglycation, methylglyoxal removal; hydrogen peroxide metabolic process; negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway; negative regulation of endoplasmic reticulum stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; negative regulation of gene expression; negative regulation of hydrogen peroxide-induced neuron intrinsic apoptotic signaling pathway; negative regulation of nitrosative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; negative regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process; negative regulation of protein acetylation; negative regulation of protein binding; negative regulation of protein export from nucleus; negative regulation of protein K48-linked deubiquitination; negative regulation of protein kinase activity; negative regulation of protein sumoylation; negative regulation of TRAIL-activated apoptotic signaling pathway; negative regulation of ubiquitin-protein transferase activity; negative regulation of ubiquitin-specific protease activity; peptidyl-arginine deglycation; peptidyl-cysteine deglycation; peptidyl-lysine deglycation; positive regulation of androgen receptor activity; positive regulation of dopamine biosynthetic process; positive regulation of interleukin-8 production; positive regulation of L-dopa biosynthetic process; positive regulation of mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone; positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation; positive regulation of protein homodimerization activity; positive regulation of protein localization to nucleus; positive regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase activity; positive regulation of superoxide dismutase activity; positive regulation of transcription by RNA polymerase II;

					positive regulation of transcription regulatory region DNA binding; protein deglycation, glyoxal removal; protein deglycation, methylglyoxal removal; protein deglycosylation; protein stabilization; regulation of androgen receptor signaling pathway; regulation of mitochondrial membrane potential	
Tektin 5	Q6AYH7	Tekt5	64455	--	Cilium assembly; cilium movement involved in cell motility; flagellated sperm motility	Sperm flagellum
Aconitate hydratase, mitochondrial	Q9ER34	Aco2	86121	3 iron, 4 sulfur cluster binding; 4 iron, 4 sulfur cluster binding; aconitate hydratase activity; iron ion binding	Citrate metabolic process; isocitrate metabolic process; liver development; response to isolation stress; tricarboxylic acid cycle	Cytoso; mitochondrion
Fructose-bisphosphate aldolase	Q6AY07	Aldoat2	39923	Fructose-bisphosphate aldolase activity	Glycolytic process	--
Histone H2B	A0A0G2JXE0	LOC102549061	13914	DNA binding; protein heterodimerization activity	Nucleosome assembly	Nucleus; chromosome
Keratin, type II cytoskeletal 8	Q10758	Krt8	53985	Protein-containing complex binding; scaffold protein binding; structural molecule activity	Cell differentiation involved in embryonic placenta development; extrinsic apoptotic signaling pathway; hepatocyte apoptotic process; response to hydrostatic pressure; response to other organism; sarcomere organization; tumor necrosis factor-mediated signaling pathway	Cytoskeleton; keratin filament; nucleus; nuclear matrix; nucleoplasm; plasma membrane; apicolateral plasma membrane; dystrophin-associated glycoprotein complex; sarcolemma; cell-cell junction; costamere; Z disc
Keratin, type I cytoskeletal 19	Q63279	Krt19	44609	Protein-containing complex binding; structural constituent of muscle	Cell differentiation involved in embryonic placenta development; Notch signaling pathway; response to estrogen; sarcomere organization	Cytoskeleton; intermediate filament; terminal web; plasma membrane; apicolateral plasma membrane; dystrophin-associated glycoprotein complex; sarcolemma; costamere; Z disc
Glycerol kinase	A0A0G2K785	Gk	62048	Glycerol kinase activity	Glucose homeostasis; glycerol-3-phosphate metabolic process; glycerol metabolic process; regulation of fatty acid metabolic process	--
Alpha-mannosidase	Q6P762	Man2b1	114825	Alpha-mannosidase activity; mannose binding; metal ion binding	Learning or memory; mannose metabolic process; protein deglycosylation	Lysosome; vacuolar membrane
Apolipoprotein E	A0A0G2K151	Apoe	41573	Amyloid-beta binding; antioxidant activity; heparan sulfate proteoglycan binding; heparin binding; lipid transporter activity; low-density lipoprotein particle receptor binding; metal chelating activity; phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity; phospholipid binding; protein-containing complex binding; protein	AMPA glutamate receptor clustering; amyloid precursor protein metabolic process; cGMP-mediated signaling; cholesterol efflux; cholesterol homeostasis; cholesterol metabolic process; chylomicron remnant clearance; fatty acid homeostasis; G protein-coupled receptor signaling pathway; high-density lipoprotein particle assembly; high-	Endoplasmic reticulum; extracellular region or secreted; chylomicron; extracellular matrix; high-density lipoprotein particle; intermediate-density lipoprotein particle; low-density lipoprotein particle; synaptic cleft; very-low-density lipoprotein particle; Golgi apparatus; plasma membran; glutamatergic synapse

homodimerization activity;tau protein binding; very-low-density lipoprotein particle receptor binding

density lipoprotein particle clearance; high-density lipoprotein particle remodeling; intermediate-density lipoprotein particle clearance; lipoprotein biosynthetic process; locomotory exploration behavior; long-chain fatty acid transport; long-term memory; negative regulation of amyloid-beta formation; negative regulation of blood vessel endothelial cell migration; negative regulation of canonical Wnt signaling pathway; negative regulation of cholesterol biosynthetic process; negative regulation of endothelial cell proliferation; negative regulation of long-term synaptic potentiation; negative regulation of MAP kinase activity; negative regulation of neuron death; negative regulation of neuron projection development; negative regulation of platelet activation; negative regulation of presynaptic membrane organization; neuron projection development; nitric oxide mediated signal transduction; NMDA glutamate receptor clustering; phospholipid efflux; positive regulation by host of viral process; positive regulation of cholesterol efflux; positive regulation of cholesterol esterification; positive regulation of dendritic spine development; positive regulation of dendritic spine maintenance; positive regulation of endocytosis; positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; positive regulation of heparan sulfate binding; positive regulation of heparan sulfate proteoglycan binding; positive regulation of lipid biosynthetic process; positive regulation of lipid transport across blood-brain barrier; positive regulation of low-density lipoprotein particle receptor catabolic process; positive regulation of membrane protein ectodomain proteolysis; positive regulation of nitric-oxide synthase activity; positive regulation of phospholipid efflux; positive regulation of

					postsynaptic membrane organization; positive regulation of transcription, DNA-templated; protein import; receptor-mediated endocytosis; regulation of amyloid-beta clearance; regulation of amyloid fibril formation; regulation of behavioral fear response; regulation of Cdc42 protein signal transduction; regulation of cellular response to very-low-density lipoprotein particle stimulus; regulation of proteasomal protein catabolic process; regulation of protein homooligomerization; response to caloric restriction; reverse cholesterol transport; triglyceride metabolic process; very-low-density lipoprotein particle clearance; very-low-density lipoprotein particle remodeling; virion assembly	
Copper-transporting ATPase 2	A0A0G2JWJ5	Atp7b	164135	ATP binding; copper-exporting ATPase activity; copper ion binding	Cellular copper ion homeostasis; cellular zinc ion homeostasis; copper ion import; lactation; protein maturation by copper ion transfer; response to copper ion; sequestering of calcium ion	Endosome; late endosome; Golgi apparatus; trans-Golgi network membrane; plasma membrane; basolateral plasma membrane; integral component of membrane; perinuclear region of cytoplasm
Cell division cycle 25 homolog A (S. cerevisiae), isoform CRA_a	G3V8T0	Cdc25a	59837	Chaperone binding; protein kinase binding; protein tyrosine phosphatase activity	Cell division; cellular response to UV; positive regulation of cell cycle G2/M phase transition	Nucleus; cytoplasm
Phosphatase and actin regulator	M0R7T1	Phactr4	74711	Actin binding; protein phosphatase 1 binding; protein phosphatase inhibitor activity	--	--
L-lactate dehydrogenase A chain	P04642	Ldha	36712	Identical protein binding; kinase binding; lactate dehydrogenase activity; L-lactate dehydrogenase activity; NAD binding	Carbohydrate metabolic; lactate metabolic process; NAD metabolic process; positive regulation of apoptotic process; post-embryonic animal organ development; response to Camp; response to drug; response to estrogen; response to glucose; response to hydrogen peroxide; response to hypoxia; response to nutrient; response to organic cyclic compound	cytoplasm
Zona pellucida 3 receptor, isoform CRA_a	G3V902	Zp3r	66130	--	--	--
Protein FAM221A	Q4V8D7	Fam221a	33681	--	--	--
Testis-specific gene 10 protein	Q9Z220	Tsga10	83644	Structural molecule activity	Spermatogenesis	Cytoskeleton; centriole; cytoplasm

14-3-3 protein theta	P68255	Ywhaq	28046	14-3-3 protein binding; identical protein binding; ion channel binding; protein C-terminus binding; protein domain specific binding; protein N-terminus binding	Negative regulation of ion transmembrane transport; negative regulation of transcription, DNA-templated	--
Annexin A1	P07150	Anxa1	39147	Calcium-dependent phospholipid binding; calcium-dependent protein binding; calcium ion binding; DNA/DNA annealing activity; double-stranded DNA-dependent ATPase activity; phospholipase A2 inhibitor activity; phospholipid binding; protein binding, bridging; protein homodimerization activity; single-stranded DNA binding; structural molecule activity	Actin cytoskeleton reorganization; adaptive immune response; alpha-beta T cell differentiation; arachidonic acid secretion; cell surface receptor signaling pathway; cellular response to glucocorticoid stimulus; cellular response to hydrogen peroxide; cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus; DNA duplex unwinding; endocrine pancreas development; estrous cycle; gliogenesis; G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second Messenger; granulocyte chemotaxis; hepatocyte differentiation; inflammatory response; innate immune response; insulin secretion; keratinocyte differentiation; monocyte chemotaxis; myoblast migration involved in skeletal muscle regeneration; negative regulation of exocytosis; negative regulation of interleukin-8 secretion; negative regulation of phospholipase A2 activity; negative regulation of protein secretion; negative regulation of T-helper 2 cell differentiation; neutrophil clearance; peptide cross-linking; phagocytosis; positive regulation of apoptotic process; positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis; positive regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle; positive regulation of interleukin-2 production; positive regulation of neutrophil apoptotic process; positive regulation of prostaglandin biosynthetic process; positive regulation of T cell proliferation; positive regulation of T-helper 1 cell differentiation; positive regulation of vesicle fusion; positive regulation of wound healing; prolactin secretion; prostate gland development; regulation of cell population proliferation; regulation of cell shape; regulation of	Cytoskeleton; actin filament; cytosol; endosome; early endosome membrane; extrinsic component of endosome membrane; extracellular region or secreted; extracellular exosome; extracellular space; lysosome; mast cell granule; mitochondrion; mitochondrial membrane, nucleus; nucleoplasm; nucleus; plasma membrane; apical plasma membrane; basolateral plasma membrane; cornified envelope; extrinsic component of external side of plasma membrane; lateral plasma membrane; phagocytic cup; plasma membrane; sarcolemma; synaptic membrane; cytoplasm; cytoplasmic vesicle membrane; motile cilium; protein-containing complex

					hormone secretion; regulation of inflammatory response; regulation of interleukin-1 production; regulation of leukocyte migration; response to corticosteroid; response to drug; response to estradiol; response to glucocorticoid; response to hormone; response to interleukin-1; response to organic cyclic compound; response to peptide hormone; response to X-ray	
RCG63538	D3ZT54	Spaca4	13955	--	--	--
Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	Q5RK28	Nmes1	9592	--	Electron transport chain; proton transmembrane transport	Mitochondrion; mitochondrial respiratory chain complex; nucleus
Tektin-4	Q6AXV2	Tekt4	52742	--	Cilium assembly; cilium movement involved in cell motility; flagellated sperm motility	Sperm flagellum
Tektin-1	Q99JD2	Tekt1	48903	--	Cilium assembly; cilium movement involved in cell motility; flagellated sperm motility	Cytoskeleton; microtubule; cytoplasm; sperm flagellum
IZUMO family member 4	D4ABT2	Izumo4	26849	--	--	--
Cylicin 1	A0A0G2K3Y3	Cylc1	70012	Structural constituent of cytoskeleton	--	--
Transmembrane protein 42	D3Z8L0	Tmem42	17127	--	--	Integral component of membrane
Radial spoke head 6 homolog A	Q4V8E8	Rsph6a	73637	--	--	--
Triosephosphate isomerase	A0A0G2JWU1	N/A	27853	Triose-phosphate isomerase activity	Gluconeogenesis; glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process; glycerol catabolic process; glycolytic process	Cytosol
FERM domain-containing 7	A0A096MJB8	Frmd7	67008	--	--	Cytoskeleton
Actin, aortic smooth muscle	A0A0G2K4M6	Acta2	42297	ATP binding; protein kinase binding	Glomerular mesangial cell development; regulation of blood pressure; response to virus; vascular smooth muscle contraction	Cytoskeleton; actin cytoskeleton; protein-containing complex; smooth muscle contractile fiber
Keratin, type I cytoskeletal 14	A0A0G2JXJ9	Krt14	47553	Structural molecule activity	--	Cytoskeleton; intermediate filament
von Willebrand factor D and EGF domains	D4AEB5	Vwde	106145	--	--	--
ATP synthase subunit e, mitochondrial	P29419	Atp5me	8249	ATPase activity; protein-containing complex binding; proton transmembrane transporter activity	ATP metabolic process; ATP synthesis coupled proton transport	Mitochondrion; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)

Erythroblast membrane-associated protein	D3Z9R6	Ermap	66576	Signaling receptor binding	Regulation of immune response; T cell receptor signaling pathway	Plasma Membrane; external side of plasma membrane ; integral component of membrane
39S ribosomal protein L17, mitochondrial	Q6PDW6	Mrpl17	20309	Protein domain specific binding; structural constituent of ribosome	Translation	Mitochondrion; mitochondrial large ribosomal subunit
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	O08727	Tnfrsf11b	47588	Cytokine activity	Apoptotic process; extracellular matrix organization; negative regulation of bone resorption; negative regulation of odontogenesis of dentin-containing tooth; response to arsenic-containing substance; response to drug; response to estrogen; response to inorganic substance; response to magnesium ion; response to nutrient; signal transduction	Extracellular region or secreted; extracellular matrix; extracellular space
Similar to TDPOZ2	A0A0G2JZT4	RGD1566337	41761	Ubiquitin protein ligase binding	Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process; regulation of proteolysis; ubiquitin-dependent protein catabolic process	Nucleus; cytoplasm
Lysine demethylase 5B	A0A0G2K3N6	Kdm5b	165911	DNA binding; histone demethylase activity; histone demethylase activity (H3-trimethyl-K4 specific); metal ion binding	Cellular response to fibroblast growth factor stimulus; chromatin remodeling; lens fiber cell differentiation; response to fungicide	Nucleus; histone methyltransferase complex
NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B10	D4A0T0	Ndufb10	21131	--	Mitochondrial respiratory chain complex I assembly	Mitochondrion; mitochondrial respiratory chain complex I
Tubulin gamma chain	F1LUW9	Tubg2	54080	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Cytoplasmic microtubule organization; meiotic spindle organization; microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization; microtubule nucleation; mitotic cell cycle; mitotic sister chromatid segregation; mitotic spindle organization	Cytoskeleton; centrosome; cytoplasmic microtubule; gamma-tubulin complex; microtubule; pericentriolar material; spindle; spindle microtubule; nucleus; cytoplasm
Nucleoporin 210-like	D3Z8Z6	Nup210l	210022	--	Sertoli cell development; spermatid development	Nucleus; nuclear pore; integral component of membrane
Maestro heat-like repeat-containing protein family member 7	A2RUW0	Mroh7	124579	--	--	Integral component of membrane
Myelin regulatory factor	D4A352	Myrf	124568	DNA-binding transcription factor activity; sequence-specific DNA binding	Central nervous system myelination; central nervous system myelin maintenance; positive regulation of myelination; positive regulation of transcription, DNA-templated	Cytosol; Golgi apparatus; nucleus Nucleoplasm; cytoplasm

Supplement 2. Proteins extracted from sperm cells of rats identified in the control, diabetic and obese groups.

Name protein	ID	Gene	Mass (Da)	Groups		
				Control	Diabetic	Obese
Tubulin beta-4B chain	Q6P9T8	Tubb4b	50225	X	X	X
ATP synthase subunit beta	G3V6D3	Atp5f1b	56309	X	X	X
Cytochrome c, testis-specific	P10715	Cyct	11849	X	X	X
Outer dense fiber protein 2	A0A0H2UHM4	Odf2	94159	X	X	X
Mitochondria-eating protein	A0A0H2UHA4	Spata18	68665	X	X	X
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P31044	Pebp1	20902	X	X	X
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	P11240	Cox5a	16347	X	X	X
Globin a4	A0A0G2JSW3	Hbb	16069	X	X	X
Hemoglobin subunit alpha-1/2	P01946	Hba1	15490	X	X	X
Tubulin alpha-3 chain	Q68FR8	Tuba3a	50612	X	X	X
Sperm surface protein Sp17	Q9Z1K2	Spa17	17142	X	X	X
Malate dehydrogenase, mitochondrial	P04636	Mdh2	36117	X	X	X
ATP synthase subunit delta, mitochondrial	G3V7Y3	Atp5f1d	17552	X	X	X
Actin, cytoplasmic 1	A0A0G2K3K2	Actb	42401	X	X	X
Beta-defensin	Q99JD1	Defb22	11417	X	X	X
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	P10888	Cox4i1	19559	X	X	X
Sperm acrosome-associated protein 9	Q4V8P4	Spaca9	19795	X	X	X
Basigin	P26453	Bsg	42865	X	X	X
Calmodulin-1	P0DP29	Calm1	16827	X	X	X
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 2A, mitochondrial	Q5XIJ9	Oxct2a	57491	X	X	X
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	P32551	Uqcrc2	48423	X	X	X
Citrate synthase	G3V936	Cs	52083	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 5	A0A0G2K509	Krt5	63095	X	X	X
Cytochrome c-1	D3ZFAQ8	Cyc1	35640	X	X	X

Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	P07895	Sod2	24887	X	X	X
Fructose-bisphosphate aldolase	Q6AY07	Aldoat2	39923	X	X	X
Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	Q8VI04	Asrgl1	34845	X	X	X
Ropporin-1	Q4KLL5	Ropn1	24173	X	X	X
Uncharacterized protein	F1LUD3	N/A	586027	X	X	X
Hypothetical LOC302884	M0R6G0	MGC105649	9593	X	X	X
GLIPR1-like 1	D3ZI91	Glpr1l1	27270	X	X	X
Phosphoglycerate kinase	M0R6Y8	RGD1560402	42391	X	X	X
Acrosin-binding protein	Q6AY33	Acrbp	36236	X	X	X
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 16	G3V8X9	Serpina16	47380	X	X	X
ATP synthase subunit d, mitochondrial	P31399	Atp5pd	18809	X	X	X
Anionic trypsin-1	P00762	Prss1	26627	X	X	X
Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated	M0R8P3	Cabyr	43246	X	X	X
Phosphoglycerate mutase 2	P16290	Pgam2	28908	X	X	X
Alpha-amylase	E9PSQ1	Amy1a	59633	X		
Protein MENT	Q5XI62	Ment	38130	X	X	X
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	P12075	Cox5b	14191	X	X	X
Peroxiredoxin-like 2A	Q6AXX6	Prxl2a	25861	X	X	X
Zona pellucida binding protein, isoform CRA_b	Q6AXU2	Zpbp	46012	X	X	X
Slc25a17 protein	B2GUY8	Slc25a17	34433	X	X	X
Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Q6AY30	Sccpdh	47514	X	X	X
Alpha-L-fucosidase	A0A0G2JSJ8	Fuca1	53723	X	X	X
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Q6P6R2	Dld	54574	X	X	X
5'-nucleotidase, cytosolic IB	A0A0G2JX78	Nt5c1b	72661	X	X	X
Solute carrier family 2 (Facilitated glucose transporter), member 3	A0A0G2JSJ3	Slc2a3	53984	X	X	X
14-3-3 protein zeta/delta	A0A0G2JV65	Ywhaz	29141	X	X	X
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	B2RYS8	Ndufb8	22058	X	X	X

Fatty acid-binding protein 9	P55054	Fabp9	15308	X		
Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	Park7	30	20190	X	X	X
LSM12 homolog	D4A8G0	Lsm12	21972	X	X	X
Protein polyglycyclase TTL10	A0A0G2JX96	Tll10	86167	X		
Similar to RIKEN cDNA 4930540L03 (Predicted)	D3Z9F9	Spaca1	37939	X		
Hyaluronidase PH-20	Q62803	Spam1	59059	X	X	X
Adenylate cyclase	G3V9G1	Adcy5	140898	X	X	X
Tubulin alpha-1A chain	P68370	Tuba1a	50788	X		X
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	A0A0G2KAM3	Pdhb	46619	X	X	X
L-lactate dehydrogenase	Q6AYX2	Ldhc	36089	X	X	X
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P15999	Atp5f1a	59831	X	X	X
Acrosin	A0A0G2K321	Acr	48876	X	X	X
Epididymal-specific lipocalin-5	P06911	Lcn5	20828	X	X	X
Carnitine O-acetyltransferase	A0A0H2UI21	Crat	71424	X	X	X
Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	A0A0H2UHE1	Suc1g1	37935	X	X	X
CD177 antigen-like	M0R4W1	LOC100909620	27029	X	X	X
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	P19234	Ndufv2	27703	X	X	X
Ras-related protein Rab-2A	F1LP82	Rab2a	22961	X	X	X
Cytochrome c oxidase subunit 2	P00406	Mtco2	26082			
Serum albumin	A0A0G2JSH5	Alb	70710	X	X	X
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P63039	Hspd1	61088	X	X	
Dynein light chain 2, cytoplasmic	Q78P75	Dynl12	10457	X		
Uncharacterized protein	F1MAE5	Prp2l1	101561	X	X	
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	P08461	Dlat	67637	X	X	X
Lysozyme c	F1M6E7	Spaca3	18862	X	X	X
Heat shock 70 kDa protein 1-like	P55063	Hspa11	70904	X	X	X
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P07632	Sod1	16073	X	X	X

Inositol-1-monophosphatase	F1M978	Impa1	30818	X	X	X
Cytochrome c oxidase subunit 6B2	Q6YFQ1	Cox6b2	10693	X	X	X
RCG44470	D3ZVR6	Slf1	122988	X		
Tubulin beta chain	G3V7C6	Tubb4b	61832	X	X	X
Tubulin alpha-8 chain	Q6AY56	Tuba8	50690	X	X	X
Carnitine O-acetyltransferase	Q704S8	Crat	71211	X	X	X
Phosphoglycerate kinase	Q5XIV1	Pgk2	45380	X	X	X
Hexokinase-1	P05708	Hk1	103540	X	X	X
Globin c2	A0A0G2JSV6	Hba-a2	15446	X	X	X
Izumo sperm-egg fusion protein 1	Q6AY06	Izumo1	44235	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 73	A0A0G2JXH6	Krt73	59372	X		X
Fibrous sheath CABYR-binding protein	Q4V7A4	Fscb	88110	X	X	
Fructose-bisphosphate aldolase A	P05065	Aldoa	39783	X	X	X
Equatorin	Q2LCV6	Eqtn	31483	X	X	
Translation initiation factor eIF-2B subunit beta	F7EVX2	Eif2b2	42192	X		
Tensin 3	F1LN91	Tns3	166629	X		
Outer dense fiber protein 2	Q6AYX5-5	Odf2	72069	X	X	X
Fc fragment of IgG-binding protein	D3ZJF8	Fcgbp	287411	X		
Hemoglobin subunit beta-2	P11517	N/A	16086	X	X	X
Arylsulfatase A	Q32KK2	Arsa	54496	X	X	X
ATP synthase subunit O, mitochondrial	Q06647	Atp5po	23440	X	X	X
Tektin-2	Q6AYM2	Tekt2	50721	X	X	
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	A0A0G2JTG1	Hspe1	9382	X	X	X
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	B2RYS2	Uqcrb	13550	X	X	X
Serine/threonine-protein phosphatase	A0A0G2JVK2	Ppp1cc	38420	X	X	X
Nuclear receptor interacting protein 3 (Predicted), isoform CRA_a	D4A2K5	Nrip3	27221	X		X
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	P19511	Atp5pb	28965	X	X	X
Uncharacterized protein	F1LZC5	N/A	16819	X	X	X
Vomer nasal type-2 receptor 116-like	A0A0G2JVY7	LOC108348133	99334	X		
RCG22622	M0RAK2	LOC684270	23199	X	X	

Tubulin beta chain	Q4QQV0	Tubb6	50483	X		
Outer dense fiber of sperm tails 2, isoform CRA_e	G3V7X0	Odf2	82322	X	X	X
Uncharacterized protein	M0R5J4	N/A	47444	X	X	X
ATP synthase subunit alpha	F1LP05	Atp5f1a	59890	X	X	X
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	B1WBQ8	Gapdhs	47376	X	X	X
Glutathione peroxidase	A0A0G2K398	Gpx4	22687	X		X
E3 ubiquitin-protein ligase RNF181	Q6AXU4	Rnf181	19674	X		X
Adenylate kinase isoenzyme 1	P39069	Ak1	21684	X		
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	G3V7N5	Cpt2	74602	X		
Adenylate kinase 2, mitochondrial	A0A0G2JSG6	Ak2	25741	X		X
Uncharacterized protein	D3ZE63	N/A	12768	X	X	
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	B0K020	Cisd1	12260	X		X
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	P29266	Hibadh	35679	X	X	
Axonemal dynein light intermediate polypeptide 1	Q4FZV3	Dnali1	29889	X		
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	P21571	Atp5pf	12487	X	X	
Tripartite motif-containing 33	D3ZUK4	Trim33	126232	X	X	X
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	P12368	Prkar2a	45794	X		
Histone H2A	M0RCL5	LOC100910554	14144	X	X	
Syntaxin-12	A0A0G2JVB6	Stx12	32520	X		
Signal-regulatory protein beta 3	A0A0G2JTD2	Sirpb3	55307	X	X	X
Hexokinase-1	M0RAQ6	Hk1	100919	X	X	X
Beta-globin	A0A0G2JTW9	Hbb-b1	16092	X		X
Nuclear pore complex protein Nup85	Q4QQS8	Nup85	75916	X		X
Heat shock 70 kDa protein 1A	P0DMW0	Hspa1a	70427	X	X	
Uncharacterized protein	A0A0G2JUG1	N/A	57880	X	X	
Kazrin	Q5FWS6-2	Kazn	37197	X	X	
Septin-9	F1LN75	Sept9	64102	X		
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	P18163	Acsl1	79155	X	X	X
A-kinase anchor protein 4	O35774	Akap4	94916	X	X	X
Similar to chromosome 14 open reading frame 8 (Predicted)	D3ZCE7	Tppp2	18641	X		

Clusterin	A0A0G2KB42	Clu	34723	X	X	X
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	A0A0G2K405	Prkar2a	48457	X	X	
Type II keratin Kb15	A0A0G2JVA8	Kb15	58459	X		
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P46462	Vcp	89977	X		X
Aspartyl aminopeptidase	Q4V8H5	Dnpep	53092	X	X	
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P62982	Rps27a	18282	X	X	
Glucose-6-phosphate isomerase	Q6P6V0	Gpi	62958	X		
RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein	A0A0G2K7M2	Rad23a	39571	X		
DOP1 leucine zipper-like protein A	D4A0Y2	Dop1a	277245	X		
Jumonji domain-containing 7	D3ZZV5	Jmjd7	36219	X		
Coiled-coil domain-containing protein 63	F1LTP5	Ccdc63	65508	X		
ERCC excision repair 6-like 2	D3ZPU4	Erc612	175208	X	X	
Radial spoke head 3 homolog	F1LRY1	Rsph3	61050	X	X	X
Tektin-3	Q4V8G8	Tekt3	56894	X	X	X
Keratin 79	A0A0G2JW69	Krt79	53076	X		
RCG60210	B0BMZ4	Spatc1	50426	X	X	
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Q68FY0	Uqcrc1	53500	X	X	X
Sperm mitochondrial-associated cysteine-rich protein	Q64298	Smcp	17075	X	X	X
Similar to testes development-related NYD-SP22 isoform 1	D4A9U1	RGD1561916	30834	X	X	X
Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	G3V926	Chuk	85815	X		
Similar to BC049730 protein	M0R867	16	21819		X	X
Solute carrier family 15 member 3	Q924V4	28	65122		X	
MICOS complex subunit MIC60	A0A0G2JVH4	104	86689		X	X
Similar to EF hand calcium-binding domain 1	F1LX06	29	25504		X	
NME/NM23 family member 5	D3ZH90	27	24205		X	
Sodium channel protein	F1LX08	16	223377		X	
ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11	P70673	16	43979		X	

Clusterin	G3V836	26	52015		X	X
NPC intracellular cholesterol transporter 2	F7FJQ3	61	17137		X	X
Heat shock-related 70 kDa protein 2	A0A0G2JUT0	48	66300		X	
Cysteine-rich secretory protein 1	P12020	46	28741		X	
Galactosidase, beta 1-like	B1WBS6	32	73443		X	X
Transforming growth factor beta-1 proprotein	P17246	29	44985		X	
Thymosin beta	A0A0G2K7A1	27	5349		X	X
Keratin, type II cytoskeletal 1	A0A0G2JST3	190	65059		X	
A-kinase anchor protein 4	F1LMR8	93	81825		X	
Glutathione S-transferase Mu 5	Q9Z1B2	76	27067		X	
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, testis-specific form, mitochondrial	Q06437	54	44049		X	X
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	F1LNF7	46	41606		X	X
Collagen type XVIII alpha 1 chain	F1LR02	36	134905		X	X
LOC683667 protein	B0BNJ1	35	21952		X	X
Outer dense fiber of sperm tails 3	D3ZE94	34	27975		X	X
WD repeat domain 72	A0A0G2K3H7	28	105075		X	
RNA-binding motif protein 39	Q5BJP4	20	58932		X	
Park7 protein	Q5BKC3	64	23002		X	
Tektin 5	Q6AYH7	46	64455		X	X
Aconitate hydratase, mitochondrial	Q9ER34	46	86121		X	
Fructose-bisphosphate aldolase	Q6AY07	112	39923	X	X	X
Histone H2B	A0A0G2JXE0	LOC102549061	13914		X	X
Keratin, type II cytoskeletal 8	Q10758	Krt8	53985		X	

Keratin, type I cytoskeletal 19	Q63279	169	44609	X	
Glycerol kinase	A0A0G2K785	153	62048	X	
Alpha-mannosidase	Q6P762	96	114825	X	
Apolipoprotein E	A0A0G2K151	50	41573	X	
Copper-transporting ATPase 2	A0A0G2JWJ5	32	164135	X	
Cell division cycle 25 homolog A (S. cerevisiae), isoform CRA_a	G3V8T0	25	59837	X	
Phosphatase and actin regulator	M0R7T1	24	74711	X	
L-lactate dehydrogenase A chain	P04642	24	36712	X	X
Zona pellucida 3 receptor, isoform CRA_a	G3V902	31	66130	X	X
Protein FAM221A	Q4V8D7	25	33681	X	
Testis-specific gene 10 protein	Q9Z220	32	83644	X	X
14-3-3 protein theta	P68255	87	28046		X
Annexin A1	P07150	78	39147		X
RCG63538	D3ZT54	38	13955		X
Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	Q5RK28	342	9592		X
Tektin-4	Q6AXV2	96	52742		X
Tektin-1	Q99JD2	45	48903	X	X
IZUMO family member 4	D4ABT2	38	26849		X
Cylicin 1	A0A0G2K3Y3	35	70012	X	X
Transmembrane protein 42	D3Z8L0	34	17127		X
Radial spoke head 6 homolog A	Q4V8E8	27	73637		X
Triosephosphate isomerase	A0A0G2JWU1	16	27853		X
FERM domain-containing 7	A0A096MJB8	14	67008		X

Actin, aortic smooth muscle	A0A0G2K4M6	215	42297	X
Keratin, type I cytoskeletal 14	A0A0G2JXJ9	29	47553	X
von Willebrand factor D and EGF domains	D4AEB5	26	106145	X
ATP synthase subunit e, mitochondrial	P29419	65	8249	X
Erythroblast membrane-associated protein	D3Z9R6	22	66576	X
39S ribosomal protein L17, mitochondrial	Q6PDW6	22	20309	X
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	O08727	18	47588	X
Similar to TDPOZ2	A0A0G2JZT4	17	41761	X
Lysine demethylase 5B	A0A0G2K3N6	26	165911	X
NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B10	D4A0T0	64	21131	X
Tubulin gamma chain	F1LUW9	20	54080	X
Nucleoporin 210-like	D3Z8Z6	19	210022	X
Maestro heat-like repeat-containing protein family member 7	A2RUW0	20	124579	X
Myelin regulatory factor	D4A352	14	124568	X