

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

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

Laíza Sartori de Camargo

BOTUCATU- SÃO PAULO
SETEMBRO/2020

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

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

LAÍZA SARTORI DE CAMARGO

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

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca-Alves

BOTUCATU- SÃO PAULO
SETEMBRO/2020

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

Camargo, Laiza Sartori de.

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

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

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

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

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

Nome do autor (a): Laíza Sartori de Camargo

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

BANCA EXAMINADORA

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

Presidente e Orientadora

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

Prof^ª. Dr^ª. Maria Denise Lopes

Membro

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

Dr^ª. Camila de Paula Freitas-Dellaqua

Membro

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

Prof^ª. Dr^ª. Maricy Apparício Ferreira

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

Dr. Daniel de Souza Ramos Angrimani

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

Data da defesa: 01 de setembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

conhecimento durante esse tempo todo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1622–1635.

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