

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

PERFIL PROTEICO DO SÊMEN DE CÃES: EM BUSCA DE UM
ANTÍGENO ESPERMÁTICO PARA CONTRACEPÇÃO

Otávio Luís de Oliveira Henriques Paulo

Botucatu/SP
Dezembro/2020

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

PERFIL PROTEICO DO SÊMEN DE CÃES: EM BUSCA DE UM
ANTÍGENO ESPERMÁTICO PARA CONTRACEPÇÃO

Otávio Luís de Oliveira Henriques Paulo

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia Animal, área de
Reprodução Animal

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana
Ferreira de Souza

Botucatu/SP
Agosto/2019

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

Paulo, Otávio Luís de Oliveira Henriques.

Perfil proteico do sêmen de cães : em busca de um
antígeno espermático para contraceção / Otávio Luís de
Oliveira Henriques Paulo. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza
Capes: 50504002

1. Cães. 2. Vacina veterinária. 3. Sêmen. 4. Epidídimo.
5. Proteômica.

Palavras-chave: Canino; Epidídimo; Plasma seminal;
Proteômica; Viabilidade espermática.

Nome do autor: Otávio Luís de Oliveira Henriques Paulo

Título: PERFIL PROTEICO DO SÊMEN DE CÃES: EM BUSCA DE UM
ANTÍGENO ESPERMÁTICO PARA CONTRACEPÇÃO

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e orientadora

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

Profa. Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

Membro

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

Dra. Caroline Scott

Membro

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

Prof. Dra. Maricy Apparício Ferreira

Membro

Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução
Animal – UNESP – Jaboticabal/SP.

Dra. Michele Silva Araujo

Membro

Departamento de Pós Graduação da faculdade UNILEYA - EAD.

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro Suplente

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

Dra. Beatrice Ingrid Macente

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Brasil – Florianópolis/ SC.

Dra. Cristiane Sella Paranzini

Membro Suplente

Departamento: Interna em Medicina de Animais de Laboratório - Primatas não Humanos -

Unidade: The Mannheimer Foundation Inc – Flórida/ EUA.

Data da Defesa: 19 de maio de 2020.

DEDICO esta tese aos meus pais e namorada pelo apoio e auxílio em todos os momentos, e a meu filho, Lucas Gabriel que me ensina, diariamente, a importância da persistência.

Agradecimentos

A Olorum, Deus Pai, Criador de tudo e de todos, por me conceder a oportunidade de crescer como homem e espírito. Sua benção, hoje e sempre.

Aos Sagrados Pais e Mães Orixás, por me darem a sabedoria, força e coragem necessárias para seguir em frente. Que Sua Luz me ilumine hoje e sempre, pois onde há Luz, as trevas não imperam.

Aos Guias, Mentores, Protetores, Mensageiros e Guardiães pelo apoio, palavras e assistência nos momentos difíceis. Meus respeitos, hoje e sempre.

Aos meus pais, Ivone e Laurentino, pelo apoio irrestrito, e por nunca terem deixado de acreditar em mim.

A minha irmã, Alessandra, pelo carinho, amizade e por ter me estimulado a buscar o título de doutor.

Ao meu cunhado Welinton, por nunca ter sido um cunhado para mim, mas um irmão.

Aos meus sobrinhos e afilhados, obrigado por fazerem parte da minha vida.

A minha namorada, Taís, pela compreensão, carinho e parceria durante este período. Sem você, não teria sido possível completar mais esta etapa dos meus estudos.

Ao meu filho, Lucas, pelo amor, compreensão, sorrisos e abraços. Por cada palavra sua e por cada passo seu. Obrigado por existir. Ser seu pai é a maior alegria que Deus me deu.

A minha orientadora, professora Fabiana Ferreira de Souza, pela paciência, ensinamentos, conselhos e sobretudo por ter acreditado em mim.

Aos professores do departamento de reprodução animal que me acolheram na UNESP com carinho e respeito.

À toda a equipe do departamento de reprodução animal e radiologia veterinária da UNESP/ Botucatu pela ajuda e parceria.

Aos residentes da Reprodução Animal da UNESP/ Botucatu, pelo respeito e carinho com que sempre me trataram.

Aos colegas mestrandos e doutorandos, meus agradecimentos pelo apoio e amizade. Em especial agradeço a Carol Scott, Michele Araújo e Cristiane Sella Paranzini com quem tive o prazer de conviver por um período maior.

A todos os colaboradores que auxiliaram para que este trabalho pudesse ser concretizado.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 – cujo apoio viabilizou a realização do presente trabalho.

Aos graduandos do curso de Medicina Veterinária, pela amizade e carinho ao me receber na sala de aula durante o estágio docência.

A todos os cães que participaram deste estudo e também aos que não participaram, mas dividiram comigo sua alegria.

...meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1.....	1
1 – Introdução e justificativa.....	2
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Espermatogênese.....	4
2.2. Composição do espermatozoide e fisiologia do movimento	7
2.3. Maturação espermática	12
2.4 Ejaculação.....	12
2.5. Reação do acrossomo e fertilização	14
2.6. Proteômica dos espermatozoides e fluídos	14
2.6.1. Proteínas do plasma seminal.....	14
2.6.2. Proteínas do fluido epididimário.....	19
2.6.3. Proteínas da célula espermática.....	20
2.6.4. Vacinas contraceptivas	21
Referências.....	25
CAPÍTULO 2.....	33
Investigação das proteínas do plasma seminal, fluido epididimário e células espermáticas de cães: a busca de uma proteína contraceptiva	38
RESUMO	39
1. Introduction.....	40
2. Material e methods.....	41
2.1. Reagents.....	Erro! Indicador não definido.
2.2. Ethical aspects.....	Erro! Indicador não definido.
2.3. Animals and experimental design	Erro! Indicador não definido.
2.4. Semen collection.....	Erro! Indicador não definido.
2.5. Semen Anayisis	Erro! Indicador não definido.
2.6. Sample preparation and mass spectrometry	Erro! Indicador não definido.
2.7. Statistics.....	Erro! Indicador não definido.
3. Results.....	Erro! Indicador não definido.
3.1. Analysis of sperm quality	Erro! Indicador não definido.
3.2. Proteomics of ejaculate spermatozoa and seminal plasma	Erro! Indicador não definido.

3.3. <i>Proteomics of epididymal spermatozoa and epididymal fluid</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4. <i>Proteomics of ejaculated and epididymal spermatozoa</i> ..	Erro! Indicador não definido.
4. Discussion	66
5. Acknowledgements	74
6. Conflict of interests	74
7. References	74
CAPÍTULO 3	69
ANEXO 1 - Dados das 16 proteínas <i>up-regulated</i> nos espermatozoides ejaculados quando comparadas as do plasma seminal pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	89
ANEXO 2 - Dados das proteínas <i>up-regulated</i> no plasma seminal quando comparadas as dos espermatozoides ejaculados pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	91
ANEXO 3 - Proteínas <i>up-regulated</i> nos espermatozoides do epidídimo quando comparadas as do fluído epididimário pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	93
ANEXO 4 - Dados das proteínas <i>up-regulated</i> no fluído epididimário quando comparadas as dos espermatozoides do epidídimo pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	998
ANEXO 5 - Proteínas <i>up-regulated</i> nos espermatozoides ejaculados quando comparadas as dos espermatozoides do epidídimo pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	100
ANEXO 6 - Proteínas <i>up-regulated</i> nos espermatozoides do epidídimo quando comparadas as dos espermatozoides ejaculados pela análise de <i>fold change</i> e test-t. ...	101

RESUMO

PAULO, O.L.O.H. PERFIL PROTEICO DOS ESPERMAZOIDES DO EJACULADO E DO EPIDÍDIMO DE CÃES: EM BUSCA DE UM ANTÍGENO ESPERMÁTICO PARA CONTRACEPÇÃO. Botucatu – SP. 2019. 47p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Vacinas contraceptivas têm sido propostas como uma forma mais rápida e menos invasiva para esterilização de cães. Este estudo objetivou descrever a relação entre as proteínas das células espermáticas ejaculadas e do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário, produzindo base experimental para o design destas vacinas. Para isso, utilizou-se 5 cães ($n = 5$), dos quais foram obtidos o ejaculado e, após a orquiectomia, o produto da recuperação da cauda do epidídimo. As amostras foram submetidas a avaliação da concentração, morfologia, cinética espermática, citometria de fluxo e teste de ligação em membrana perivitelínica de ovo, sendo separadas em 4 grupos: plasma seminal (PS), fluido epididimário (FE), espermatozoides do ejaculado (EJAC) e do epidídimo (EPID). Para análise proteômica a digestão das proteínas dos 4 grupos foi feita *in gel* e avaliadas em espectrômetro de massas Q-Tof. Os parâmetros de motilidade progressiva, retilinearidade, linearidade, coeficiente de oscilação, produção de H_2O_2 e percentagem de membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada foram mais expressivos ($P < 0,01$) no grupo EJAC do que no EPID. Foram encontradas 177 proteínas entre EJAC e PS (16 *up-regulated* no EJAC e 14 no PS); 241 proteínas entre EPID e FE (27 *up-regulated* no EPID e 14 no FE); e 210 proteínas entre EJAC e EPID (3 *up-regulated* no EJAC e 17 no EPID).

Palavras-chave: canino, epidídimo, plasma seminal, proteômica, viabilidade espermática

ABSTRACT

PAULO, O.L.O.H. PROTEIN PROFILE OF SPERMATOZOA FROM EJACULATED AND EPIDIDYMIS OF DOGS: SEARCHING FOR A SPERMATIC ANTIGEN FOR CONTRACEPTION. Botucatu – SP. 2019. 47p. Thesis (Doctoral Degree) – School of Veterinary Medicine and Zootechnics, Campus Botucatu, São Paulo State University.

Contraceptive vaccines has been proposed as a faster and less invasive way to sterilize dogs. This study aimed to describe the relation between proteins of ejaculated sperm cells and epididymis, seminal plasma and epididymal fluid, producing an experimental basis for designing these vaccines. For this, 5 dogs (n = 5) were used, from which the semen and, after orchiectomy, the epididymis tail recovery product was obtained. Samples were submitted to concentration, morphology, sperm kinetics, flow cytometry and egg perivitellin membrane binding test analysis, and separated into 4 groups: seminal plasma (PS), epididymal fluid (EF), ejaculate spermatozoa (EJAC) and epididymis spermatozoa (EPID). For proteomic analysis the protein digestion of the 4 groups was performed in gel and evaluated by Q-Tof mass spectrometer. The parameters of progressive motility, rectilinearity, linearity, wobble, H₂O₂ production and percentage of plasma membrane integrity and damaged acrosomal membrane were more expressive (p <0.01) in the EJAC group than in EPID group. 177 proteins were found between EJAC and PS (16 up-regulated in EJAC and 14 in PS); 241 proteins between EPID and FE (27 up-regulated in EPID and 14 in FE); and 210 proteins between EJAC and EPID (3 up-regulated in EJAC and 17 in EPID).

Keywords: canine, epididymis, proteomics, seminal plasma, sperm viability

CAPÍTULO 1

1 – Introdução e justificativa

No Brasil, existem 52,2 milhões de cães, 22,1 milhões de gatos e quatro milhões de outros pets. Em média, as cidades brasileiras possuem uma relação de um cão para cada seis habitantes e um gato para cada 16 habitantes (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015). É difícil computar o número de animais não domiciliados ou errantes, muitos deles resultados de crias indesejadas e abandono. Contudo sua superpopulação é um risco tanto para a saúde pública, com a transmissão de zoonoses e ataques a seres humanos, quanto para os animais que ficam sujeitos a maus tratos e privação de alimento. (LIMA et al., 2010). Há também o risco destes animais influenciarem negativamente espécies ameaçadas nativas, seja por predação ou por competição interespecífica, independentemente de estarem em áreas protegidas ou da densidade populacional local (LESSA et al., 2016). Diferentes trabalhos apontam que esta é uma questão de relevância internacional (BUTLER et al., 2004; BUTLER; DU TOIT, 2002; REECE et al., 2008; REESE, 2005; NATOLI et al. 2006). Desta forma, faz-se necessário o controle de natalidade destes animais, a fim de reduzir as consequências da superpopulação.

A esterilização cirúrgica é o método mais utilizado em pequenos animais para o controle populacional, embora seja uma técnica invasiva e de custo elevado, que requer anestesia, profissionais qualificados, equipamentos próprios e centros cirúrgicos para realizá-la, além de cuidados pós-operatórios. Com isso, o interesse em métodos não cirúrgicos de controle populacional de animais vem aumentando cada vez mais, sobretudo em países em desenvolvimento (DONAVAN, et al., 2012; PALMER et al., 2018).

Vacinas contraceptivas ou esterilizantes têm sido estudadas como método contraceptivo para animais e humanos. Na medicina veterinária, busca-se por uma vacina esterilizante que não necessite de reaplicações para alcançar seu efeito e que tenha longa durabilidade. Vacinas contraceptivas são produzidas contra os hormônios da reprodução e contra antígenos relacionados aos gametas (espermatozoides ou ovócitos) (MEEUSEN et al., 2007).

O desenvolvimento de uma vacina contraceptiva objetiva alcançar uma resposta imune capaz de bloquear uma parte do processo reprodutivo de forma segura e eficaz. Vacinas baseadas nos hormônios da reprodução visam

neutralizar os níveis circulantes dos mesmos, enquanto as baseadas nos antígenos de óvulos e espermatozoides buscam interferir no processo de fertilização (ALEXANDER, BIALY, 1994). O entendimento de que anticorpos obtidos contra hormônios e gametas estão associados com a infertilidade embasam a possibilidade de usar a imunização como método contraceptivo (PRIMAKOFF et al., 1990). Este método inicia-se com a identificação de componentes essenciais para o processo reprodutivo. A partir deste conhecimento, uma versão recombinante é gerada e expressa em sistemas específicos para a produção em larga escala. O antígeno sintético é combinado com uma molécula carreadora e utilizado como vacina injetável ou oral. A formulação estimula o sistema imunológico a gerar uma resposta contra o antígeno específico, suprimindo a fertilidade. Dois tipos de resposta imune são gerados: humoral (anticorpos circulantes) que bloqueia a fertilidade por se ligar e bloquear a função do antígeno no trato reprodutor; e a celular (células T) que destrói diretamente a célula produtora do antígeno, causando esterilidade permanente (SCHILLER, 2010). Assim, a vacinação com antígenos espermáticos (peptídeos recombinantes, peptídeos sintéticos ou DNA) causam contracepção de machos e fêmeas por induzir a resposta sistêmica e anticorpos antiespermatozoides locais (NAZ, 2011a).

Modernas técnicas de biologia molecular, como o estudo do proteoma espermático, podem ser empregadas para produzir base experimental para o design de inibidores de pequenas moléculas com efeitos antifertilidade (SURI, 2005, 2007).

A análise proteômica consiste no campo de pesquisa que trata da identificação em larga escala dos componentes proteicos expressos pelo genoma (ANDERSON; ANDERSON, 1998). Na reprodução animal, a análise proteômica pode desempenhar importante papel na identificação de proteínas que possam ser estabelecidas como marcadores de fertilidade para a seleção de reprodutores, ou ainda, na seleção de ejaculados com maior tolerância ao processo de congelação/descongelação, diminuindo gastos e potencializando os resultados (BARROS et al., 2013). Resultados destes estudos têm encontrado diferentes moléculas relacionadas à fertilidade, incluindo algumas capazes de promover a contracepção. No cão, poucos estudos envolvendo proteínas provenientes do

plasma seminal e da membrana espermática foram conduzidos com este propósito, apesar da necessidade e busca continua por um método contraceptivo de baixo custo e pouco invasivo para o controle populacional na espécie.

O objetivo deste estudo é descrever a relação entre as proteínas das células espermáticas ejaculadas e do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário e estabelecer uma relação entre as proteínas de destaque nestes grupos e a capacidade de concepção de um novo indivíduo.

2. Revisão de Literatura

2.1. Espermatogênese

O processo de formação contínua dos espermatozoides é denominado espermatogênese. Este processo inicia-se na puberdade e continua por toda a vida do macho envolvendo diferentes etapas: mitose celular, que promove a renovação de espermatogônias; divisão e diferenciação das espermatogônias; meiose celular visando a redução do número de cromossomos, que permita, após a fecundação do ovócito, a geração de uma célula diploide com os genes maternos e paternos; e a espermiogênese, que é a diferenciação da célula haploide com formato arredondado, comum a outras células, em uma estrutura diferenciada e complexa denominada espermatozoide (FOOTE et al.,1972).

A espermatogênese ocorre no interior dos túbulos seminíferos, estruturas espiraladas que compõem a maior parte do parênquima testicular. Entre os túbulos seminíferos há um tecido intersticial, no qual estão localizadas as células de Leydig, produtoras de testosterona, vasos sanguíneos e linfáticos, além de nervos e tecido conjuntivo (Figura 1, FAWCETT et al.,1973).

Cada túbulo seminífero é envolto por uma membrana basal que os separa do tecido intersticial. A separação entre os tecidos é denominada barreira hemato-testicular, composta por células mióides peritubulares e pela justaposição dos processos citoplasmáticos das células de Sertoli contíguas, com junções comunicantes, próximas do local que iniciam-se as meioses celulares (FAWCETT et al., 1970). Esta barreira tem como função criar um ambiente adequado à diferenciação das células em espermatozoides, impedir a passagem de substâncias de alta massa molecular e a ação do sistema imunológico, que passaria a reconhecer as células haploides como estranhas ao organismo

(MRUK; CHENG, 2004).

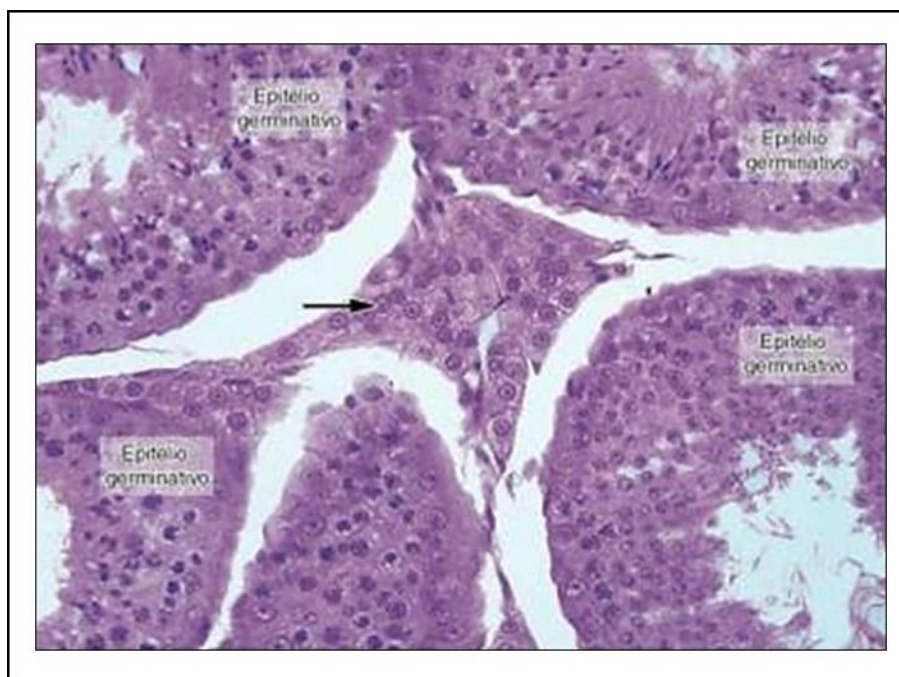


Figura 1. Túbulos seminíferos e tecido intersticial. A seta aponta as células de Leydig e o epitélio germinativo. Fonte JUNQUEIRA e CARNEIRO (2013).

Já os túbulos seminíferos são compostos por três compartimentos, basal, adluminal e lúmen. O compartimento basal é composto por células diploides, que ainda não passaram pela meiose, enquanto que o compartimento adluminal compreende as células que passaram ou estão passando de meiose, tornando-se haploides. Este processo de diferenciação se dá a partir da membrana basal em direção ao lúmen do túbulo seminífero conforme ocorre a divisão celular. Assim, próximas da membrana basal estão as espermatogônias que vão se diferenciando em espermatócitos primários e secundários, espermatídes redondas (iniciais) e alongadas (finais) e, quando junto ao lúmen, em espermatozoides (Figura 2, FOOTE et al., 1972).

Na face interna dos túbulos seminíferos, ao longo de toda sua extensão, estão dispostas as células de Sertoli, cuja função é nutrir e sustentar as células germinativas que darão origem aos espermatozoides. A espermatogênese é dividida em 3 fases: espermatocitogênese, de meiose e espermiogênese (JOHNSON et al., 1997). Na fase de espermatocitogênese, as espermatogônias do tipo A (células tronco) ou primordiais sofrem uma série de divisões mitóticas,

originando espermatogônias intermediárias e posteriormente do tipo B. Esta fase é importante para a renovação das células tronco. Após mais uma divisão por mitose, originam os espermatócitos primários. A partir deste ponto inicia-se a fase meiótica, a qual envolve os espermatócitos primários e secundários para a formação de espermátides redondas (iniciais) haploides. A terceira fase é a de diferenciação ou espermiogênese, que não envolve divisões celulares e as espermátides redondas se alongam dando origem aos espermatozoides (Figura 3).

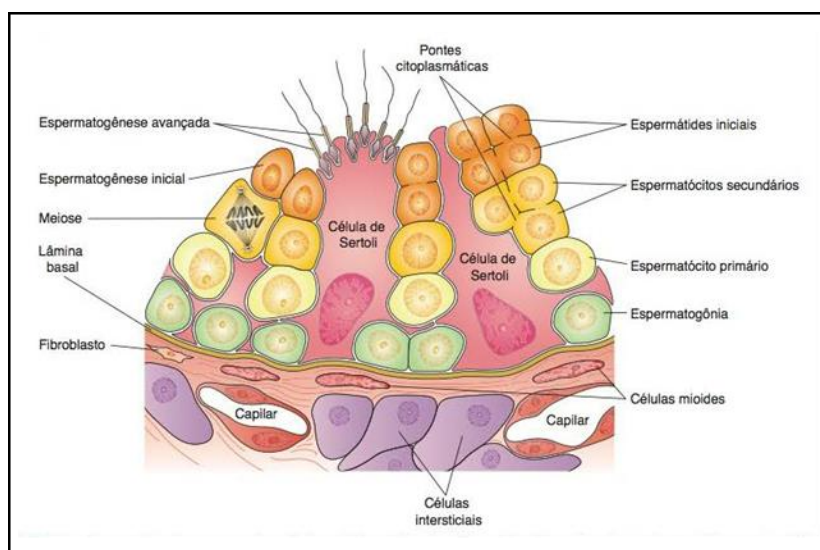


Figura 2. Segmento do túbulo seminífero e tecido intersticial mostrando a formação do epitélio seminífero e populações celulares. Fonte: JUNQUEIRA e CARNEIRO (2013).

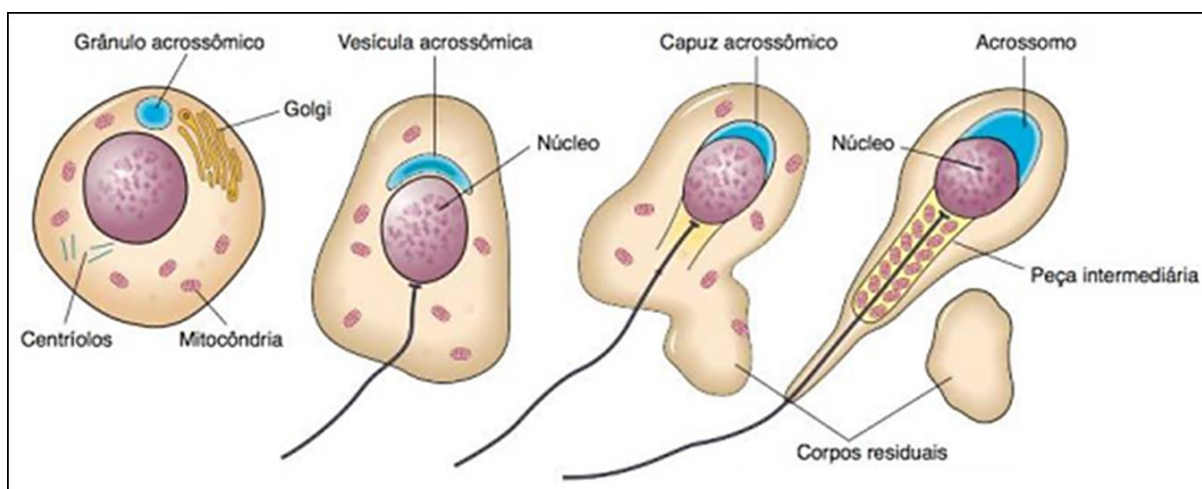


Figura 3. Modificações das espermátides para formação dos espermatozoides, durante a espermiogênese. Fonte: JUNQUEIRA e CARNEIRO (2013).

Esta diferenciação compreende a formação do acrossoma pelo aparelho de Golgi, da cauda pelos centríolos, a formação da peça intermediária contendo as mitocôndrias e a condensação do núcleo, quando as proteínas da cromatina (histonas) aumentam sua quantidade de arginina, cisteína e o número de pontes dissulfeto. O espermatozoide formado é então liberado no lúmen do túbulo seminífero e conduzido ao epidídimo para maturação (JOHNSON et al., 1997).

Uma vez liberados no lúmen, os espermatozoides, imersos em um fluido produzido pelas células de Sertoli e composto por diferentes moléculas e íons, são conduzidos aos túbulos retos, localizado no mediastino testicular, que compõe a rede testicular ou *rete testis* que desembocam nos ductos eferentes, cuja junção resultará no ducto epididimário (O'DONNEL et al., 2011).

No cão, a espermatogênese ocorre em um intervalo de 62 dias, ou seja, 4,5 vezes a duração de um ciclo espermático que é de 13,6 dias (JOHNSTON et al., 2001).

2.2. Composição do espermatozoide e fisiologia do movimento

O espermatozoide, ao final de sua diferenciação celular, é dividido em cabeça e cauda e é recoberto por membrana plasmática em toda sua extensão. O interior da cabeça espermática contém o material genético condensado que será usado na formação do zigoto. Em sua porção anterior e recobrindo a cabeça do espermatozoide, encontra-se o conteúdo acrossomal, delimitado pelas membranas acrossomais interna e externa. O conteúdo acrossomal é composto por enzimas, cujo principal papel está envolvido na superação da zona pelúcida que envolve o ovócito (GARNER, HAFEZ, 2004).

O axonema é a principal estrutura da cauda do espermatozoide e é formada por nove pares de microtúbulos periféricos distribuídos em torno de um par de microtúbulos centrais. Os microtúbulos são compostos principalmente pelas proteínas α e β tubulinas, sendo que cada microtúbulo é formado por um conjunto de duas subfibras A e B. De cada par de microtúbulos externos, a partir da subfibra A, projetam-se um braço externo e um interno formados por uma proteína chamada de dineína, constituindo a força motriz que movimentará a cauda do espermatozoide. Existem também nove estruturas radiais que partem dos microtúbulos periféricos em direção aos microtúbulos centrais, em um padrão

helicoidal, e uma proteína de ligação chamada nexina que ajuda a dar estabilidade ao conjunto (RAHME; HENRY, 2013).

A cauda do espermatozoide é subdividida em colo ou pescoço, peça intermediária, peça principal e peça terminal da cauda. O colo é o local de ligação entre a cabeça e a cauda do espermatozoide. A peça intermediária é a região na qual as mitocôndrias estão alinhadas em torno da cauda. Neste ponto, a cauda possui nove fibras densas externas, que se colocam ao redor dos microtúbulos periféricos do axonema e são envolvidos por uma bainha mitocondrial exclusiva da peça intermediária. Entre as peças intermediária e principal existe uma estrutura chamada *anulus* que as delimita. A peça principal, além de não possuir a bainha mitocondrial tem o número de fibras densas reduzidas de 9 para 7, uma vez que as fibras densas 3 e 8 dão lugar a colunas longitudinais de bainhas fibrosas que são interconectadas por estruturas chamadas de costelas que conferem estabilização as mesmas. Estas colunas longitudinais são estruturas exclusivas da peça principal. A peça terminal é a parte final da cauda onde existe apenas o axonema envolto pela membrana plasmática (Figura 4 e 5, TURNER, 2003).

Os movimentos da cauda são responsáveis pela motilidade e propulsão do espermatozoide. Em mamíferos, existem dois tipos de movimentos, o ativo e o hiperativo (SUAREZ; OSMAN, 1987). O movimento ativo é simétrico e de baixa amplitude, sendo adequado para que o espermatozoide se desloque do modo retilíneo, a fim de ultrapassar o útero e chegar à tuba uterina (TURNER, 2006). O movimento hiperativo é assimétrico, de alta amplitude e ocorre após a capacitação do espermatozoide, facilitando sua aproximação e penetração no ovócito (HO; SUAREZ, 2001).

Para que o espermatozoide se movimente é preciso uma fonte de energia como o ATP, que é obtido, assim como em outras células, pelo processo de respiração mitocondrial. Diferentemente de outras células, as mitocôndrias do espermatozoide possuem uma variedade de enzimas que, quando desequilibradas, geram defeitos no metabolismo mitocondrial, sem afetar as demais células somáticas (TURNER, 2006).

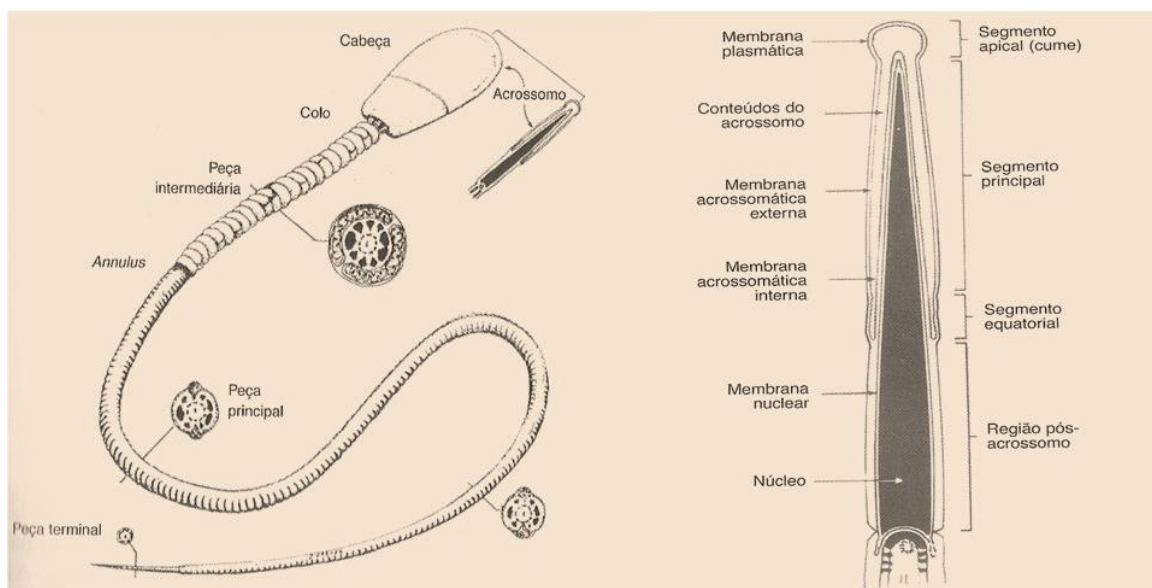


Figura 4. Porções da célula espermática (Fonte: adaptado de GARNER; HAFEZ, 2004).

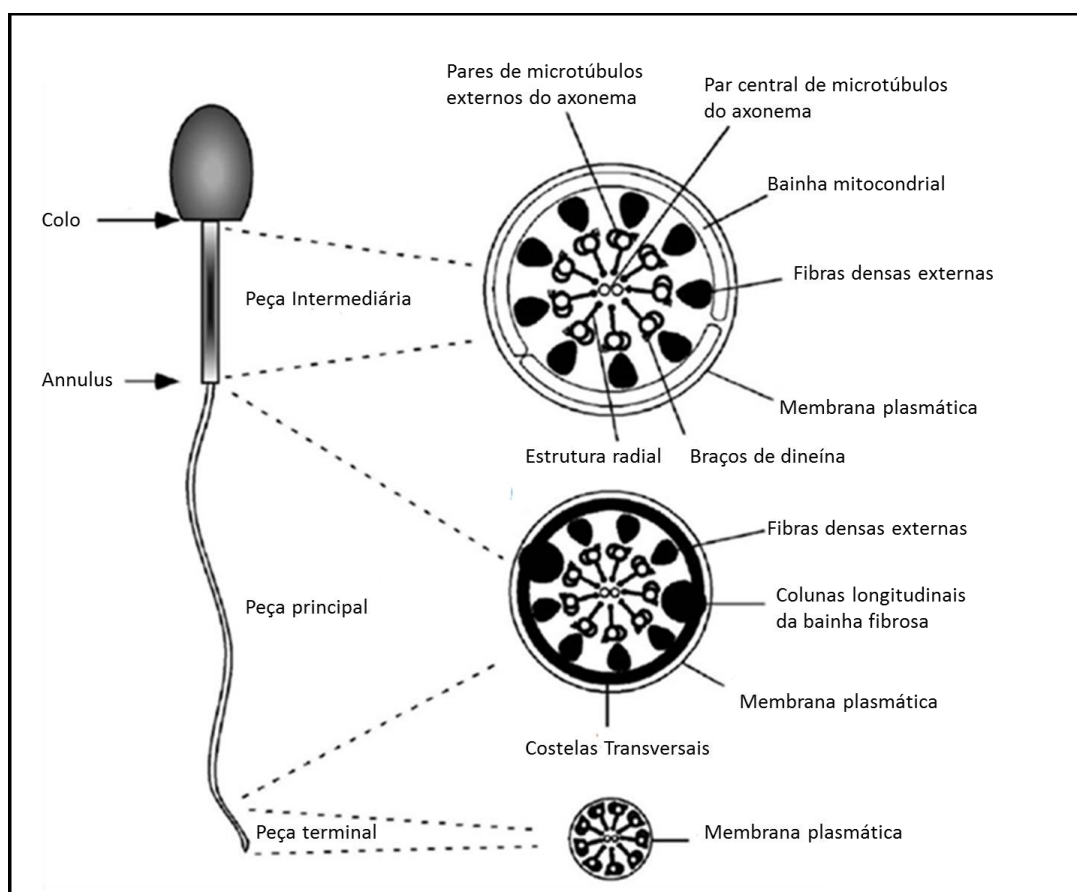


Figura 5. Estrutura do flagelo do espermatozoide de mamíferos (Fonte: adaptado de TURNER, 2003).

Foram demonstradas diferenças metabólicas relacionadas a espécie nas mitocôndrias espermáticas, influenciando na capacidade dos espermatozoides de diferentes espécies em metabolizar diferentes substratos. Isto pode estar relacionado com as diferenças no substrato encontrado no aparelho reprodutor das fêmeas de cada espécie e pode explicar a necessidade de se utilizar diferentes meios extensores para diferentes espécies (STOREY, KAYNE, 1980).

Além da atividade mitocondrial, que é restrita a peça intermediária, o espermatozoide obtém a maior parte da energia requerida para a movimentação de sua cauda pela glicólise realizada ao longo das colunas da bainha fibrosa presentes na peça principal (TURNER, 2006).

O início da movimentação da cauda do espermatozoide é regulado principalmente pela ação da adenosina monofosfato cíclica (*cAMP*) sobre a ativação da proteína quinase A (*PKA*) e pela variação dos níveis de cálcio na célula espermática (RAHME; HENRY, 2013).

De forma simplificada, a movimentação do espermatozoide inicia pela ativação da ATPase dineína, que causa a ligação e contração dos braços de dineína e promovendo o deslizamento dos pares de microtúbulos de uma hemiparte da cauda do espermatozoide, enquanto a outra parte permanece em repouso. A seguir, os microtúbulos ativados voltam a posição de repouso e em seguida os da outra hemiparte são ativados. Esta condição vai se alternando e, desta forma, conforme estes túbulos deslizam entre si a cauda do espermatozoide se dobra, produzindo o movimento (Figura 6, TURNER, 2003).

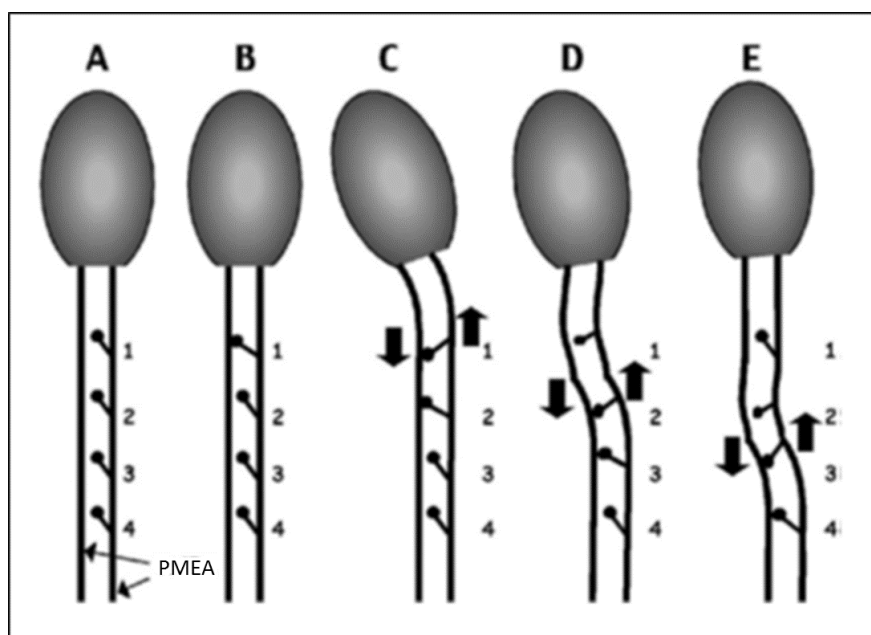


Figura 6. Mecanismo de movimento espermático simplificado no qual a dineína do axonema gera a frequência flagelar. As linhas paralelas representam os pares de microtúbulos externos do axonema (PMEA). As estruturas numeradas representam os braços de dineína entre os PMEAs. (A) Nenhum dos braços de dineína está ativo e não há curvatura flagelar. (B) O primeiro braço de dineína se ligou ao par de microtúbulos adjacente. (C) O primeiro braço de dineína gerou um movimento para baixo, resultando em microtúbulos adjacentes passando um pelo outro (setas grandes). Como os dois pares de microtúbulos estão ancorados na cabeça do espermatozóide, essa força deslizante é traduzida em uma curva do axonema - o início de uma batida flagelar. Além disso, o segundo braço de dineína se ligou ao par de microtúbulos adjacente. (D) O primeiro braço de dineína liberou o par de microtúbulos adjacente, enquanto o segundo braço de dineína gerou um movimento para baixo. Isso resulta na propagação da curvatura flagelar ao longo do comprimento dos microtúbulos. O terceiro braço de dineína se ligou ao microtúbulo adjacente. (E) O batimento flagelar está sendo propagado pelo movimento descendente do terceiro braço de dineína, enquanto o segundo braço de dineína libera o par de microtúbulos adjacente e o primeiro braço de dineína retorna à sua posição original, preparando-se para outro movimento. Essa sequência acontece para todos os 9 pares de braços de dineína e seus 9 pares de microtúbulos externos associados de maneira assíncrona, mas coordenada, ao redor da circunferência e ao longo de todo o comprimento do flagelo, resultando em um batimento flagelar normal. (Fonte: TURNER, 2003)

2.3. Maturação espermática

O espermatozoide liberado no lúmen dos túbulos seminíferos, ainda está imaturo e, para que possa fertilizar o ovócito, deve passar por um processo de maturação que ocorre no epidídimo ao entrar em contato com os componentes do fluido epididimário, secretados por suas células estruturais (JERVIS; ROBAIRE, 2001).

O epidídimo é uma estrutura adjacente ao testículo, que pode ser anatomicamente dividida em cabeça, corpo e cauda. Na cabeça e corpo ocorre a maturação, enquanto na cauda, o espermatozoide maturo é armazenado em um estado de quiescência, obtido pelo controle de pH e pelos baixos níveis de cálcio (GARNER; HAFEZ, 2004).

O fluido epididimário é composto principalmente por proteínas e lipídios oriundos das secreções do epitélio epididimário (GUYONNET et al., 2011), controladas principalmente pela di-hidrotestosterona (TURNER, 1991).

Durante o processo de maturação ocorre o aumento da compactação do DNA no núcleo do espermatozoide, aumento da concentração intracelular de adenosina monofosfato (AMPc), aumento da permeabilidade e alterações na membrana plasmática influenciando o potencial mitocondrial e motilidade espermática, e migração da gota citoplasmática para a porção distal da cauda do epidídimo (HENRY; ECHEVERRY, 2013).

2.4 Ejaculação

Para que a ejaculação ocorra é preciso que o macho apresente ereção peniana. A ereção canina ocorre por estímulo olfativo, despertado pela ação de feromônios liberados pela fêmea no período do estro, ou mesmo pela associação entre a rotina de tratamento e o coito (ENGLAND, G.C.W., 2013).

Para que a ereção aconteça, é preciso a ação de impulsos vindos dos nervos erigentes, que são compostos de fibras parassimpáticas oriundas das fibras dos nervos sacrais e pélvicos. Estes impulsos levam a dilatação das artérias pudendas externa e interna, alimentando de sangue o corpo cavernoso do pênis. Ocorre então a contração dos músculos isquiouretrais que limita o retorno venoso da área. O sangue retido causa a intumescência do bulbo peniano e a elongação da glândula. O intumescimento do bulbo peniano impede a retirada

do pênis do trato genital feminino, prevenindo o refluxo espermático enquanto acontece a ejaculação (KUTZLER, 2005)

Na sequencia o macho instintivamente vira-se de costas para a cadela, promovendo a rotação peniana em 180° em direção caudal. O osso peniano do cão previne a oclusão do óstio uretral durante e ereção e rotação peniana (GRANDAGE, 1972).

A ejaculação acontece pela estimulação dos nervos simpáticos do pênis, que geram contrações dos músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso, impelindo o conteúdo dos ductos deferentes e fluido prostático para o canal da uretra (KUTZLER, 2005).

O ejaculado canino possui três frações distintas. A primeira e a última são produzidas pela próstata, que é a única glândula acessória presente na espécie (ENGLAND, ALLEN, 1990). A primeira fração tem a ação de limpar o canal da uretra para que urina ou debris celulares não influenciem negativamente no sêmen. Durante o acasalamento esta primeira fração acaba sendo descartada antes da penetração na fêmea (ENGLAND, G.C.W., 2013). A terceira fração tem a função de impelir a segunda fração, ejaculada na porção cranial da vagina, diretamente para o útero, onde o aumento das contrações uterinas causadas pelo acasalamento conduz o sêmen viável ao corno uterino e estimula a eliminação de espermatozoides mortos e outros possíveis contaminantes do útero (ENGLAND et al., 2006).

A segunda fração é a rica em espermatozoides e é proveniente do ducto deferente, sendo ejaculada após o intumescimento do bulbo peniano. Com o término da ejaculação, a ereção termina e o pênis pode ser removido da cadela (ENGLAND, G.C.W., 2013).

Espermatozoides armazenados em fluido prostático tornam-se menos viáveis do que os armazenados em meios extensores. Entretanto durante a cópula é provável que o fluido prostático atue juntamente com o plasma seminal prevenindo que o sêmen seja prejudicado por células polimorfonucleares e colaborando no preparo do substrato do trato reprodutor da cadela, modulando efeitos inflamatórios locais causados pela deposição do sêmen no canal vaginal (ENGLAND et al., 2013).

2.5. Reação do acrossomo e fertilização

Ao chegar próximo ao ovócito, sob influência da progesterona e do cálcio, o espermatozoide sofre um processo denominado reação do acrossomo, que se liga a zona pelúcida e promove a liberação das enzimas presentes no acrossoma, permitindo assim que o mesmo ultrapasse esta barreira. Esta ligação é espécie específica e ocorre pela ligação com proteínas, chamadas de *egg binding proteins*, localizadas na membrana da cabeça do espermatozoide (HENRY; ECHEVERRY, 2013).

Após superar a zona pelúcida, a membrana acrossomal interna liga-se a membrana do óvulo, para a fertilização. Este mecanismo é conduzido via ação de proteínas de superfície celular, chamadas ADAM (desintegrina A e metaloprotease) (WOLFSBERG; WHITE, 1996).

2.6. Proteômica dos espermatozoides e fluídos

2.6.1. Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal é um fluido composto por um conjunto de secreções do testículo, epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Conhecer a composição deste fluido auxilia na compreensão dos mecanismos que envolvem a função espermática antes e após a ejaculação (AQUINO-CORTEZ et al., 2017).

Evidências sugerem que o plasma seminal exerce múltiplos efeitos na função espermática e no trato genital feminino. Uma característica essencial da maturação pós-testicular é a remodelação da superfície espermática por interações específicas de proteínas e glicoproteínas, as quais são secretadas no trato feminino e estão também presentes no plasma seminal. Proteínas secretórias, ligadas aos espermatozoides, parecem estar envolvidas no estabelecimento dos reservatórios espermáticos na tuba uterina, no controle da capacitação espermática pela ação negativa (fatores decapacitantes), como fatores de regulação positiva (estimulação da capacitação) e nos eventos iniciais e centrais do processo de fertilização, estabelecendo um reservatório de espermatozoides na tuba uterina, modulando a capacitação e a interação dos gametas (MANJUNATH e THERIEN, 2002; TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

No cão, o plasma seminal é composto pela secreção de apenas uma glândula sexual acessória, a próstata, cujas funções são andrógeno dependentes

(DUBÉ et al., 1983; FRENETTE et al., 1987; ENGLAND, ALLEN, 1990). Essas secreções, em grande parte, são proteínas enzimáticas (ISACS; COFFEY, 1984), e a principal delas é arginina esterase, conhecida como proteína específica prostática canina (*Canine Prostatic Arginine Esterase - CPSE*) (CHAPDELAINE et al. 1984; McENTEE et al., 1987), consistindo 90% das proteínas secretadas pela próstata e 30% das proteínas do plasma seminal (DUBÉ, 1994). Foi descrito um alto grau de afinidade entre a arginina esterase do plasma seminal e uma HBP (*Heparin Biding Protein*) equina (SSP-7) (CALVETE et al., 1995). O significado in vivo da sua atividade proteolítica ainda permanece desconhecido, alguns autores sustentam a hipótese de que a CPSE se liga ao espermatozoide, assim, a enzima poderia catalisar proteínas na superfície espermática ou poderia ser transportada como proteína “ligada” e agir em sítios distantes (DUBÉ, 1994).

No cão, Souza et al. (2002), utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições desnaturantes, encontraram no plasma seminal 25 bandas, com pesos moleculares variando de 136 kDa a 3,5 kDa, em 5 cães de fertilidade desconhecida. Posteriormente, com um número maior de cães (n=20), foram identificadas 37 bandas e verificou-se uma correlação positiva entre a densitometria de duas bandas proteicas (67 kDa e 58,6 kDa) e a motilidade espermática, vigor e testes que avaliaram a integridade e funcionalidade da membrana espermática (SOUZA, 2003; SOUZA et al., 2007). Semelhantemente, Cheema et al. (2011), em estudo com plasma seminal de cães (n=5), correlacionaram positivamente proteínas com pesos moleculares de 82 kDa, 70 kDa, 24 kDa e 14 kDa com a motilidade espermática, porcentagem de espermatozoides vivos e integridade de membrana.

Souza et al. (2006) identificaram um grupo de proteínas com afinidade de ligação à heparina no plasma seminal e, posteriormente, na membrana espermática de cães (SOUZA et al., 2008). Estes autores sugeriram que uma destas proteínas poderia ser uma subunidade (15,6 kDa) da arginina esterase do plasma seminal canino, a qual, em estudo posterior (SOUZA et al., 2009) foi marcada com um anticorpo antiosteopontina bovina, uma proteína identificada em touros de alta fertilidade por Killian et al. (1993) e caracterizada por Cancel et al. (1997). Martins (2005) também sugeriu que uma banda de peso aproximado a 15,6 kDa poderia ser uma subunidade da arginina esterase e determinou uma

correlação positiva entre a densitometria desta banda e a motilidade espermática e integridade da membrana do sêmen fresco ou descongelado.

Dubé et al. (1985), analisaram e compararam as características físico-químicas das proteínas arginina esterase prostática canina (canine prostatic arginine esterase - CPSE) e antígeno específico da próstata (prostatic specific antigen – PSA) de humanos. Verificou-se que, apesar de distintas, possuem semelhanças como pesos moleculares similares (29 KDa para CPSE e 34 KDa para o PSA) e atividades enzimáticas similares frente a substratos proteicos, o que sugere que o cão possa atuar como modelo em estudos relacionados a PSA.

A osteopontina (OPN) foi descrita como presente no plasma seminal de cães (SOUZA et al., 2009). Em outras espécies a OPN foi relacionada positivamente com fertilidade, a exemplo em touros (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997; SOUZA et al., 2008), em garanhões (BRANDON et al., 1999; WAHEED et al., 2013) em búfalos (PERO et al., 2006), em humanos (EL-HAGGAR et al., 2013) e em várias outras espécies (DRUART et al., 2013). Esta proteína tem atuação em processos de adesão celular, ossificação e estabilização da membrana plasmática durante a criopreservação espermática (BARUAH et al., 2017).

Souza et al. (2008; dados não publicados) também estudaram o proteoma do plasma seminal e da membrana espermática de cães por eletroforese bidimensional e identificaram correlações entre diferentes spots e as características do sêmen fresco e descongelado e aos resultados do teste de ligação/penetração em oócitos homólogos. Foram encontrados 179 e 87 *spots*, no plasma seminal e na membrana espermática, respectivamente. Dentre as várias correlações determinadas, as mais importantes foram: correlação positiva entre o spot 17,3 kDa, pI 9,7 da membrana espermática e número de espermatozoides após a descongelação ligados/penetrados aos oócitos e porcentagem de oócitos interagidos no teste de ligação/penetração em oócitos homólogos. No plasma seminal uma correlação negativa foi verificada entre o spot 28,9 kDa, pI 7,80 e a motilidade espermática do sêmen fresco. Na eletroforese de extratos da membrana espermática identificaram uma correlação positiva entre a banda 66,4 kDa e a motilidade total e progressiva do sêmen fresco; e entre a banda 54,6 kDa e a motilidade progressiva do sêmen fresco e a motilidade total e progressiva do

sêmen congelado.

Mogielnicka-Brzozowska et al. (2012), investigaram as proteínas de ligação ao zinco (*Zinc Binding Proteins – ZnBPs*) no plasma seminal de cães (n= 6) por meio de cromatografia e eletroforese. Foi observado que as proteínas de ligação ao zinco correspondem de 4 a 10% do total de proteínas presentes no plasma seminal. Neste grupo de proteínas, foram reveladas 13 bandas com peso molecular entre 11,6 kDa e 152,3 KDa. Dentre estas frações proteicas, verificou-se que as de peso molecular de 11.6 kDa e 14.3 kDa representam de 28 a 30% do total de proteínas de ligação ao zinco encontradas no plasma seminal. Em um estudo subsequente, Mogielnicka-Brzozowska et al. (2014), demonstraram a importância das proteínas de ligação ao zinco (*Zinc Binding Proteins – ZnBPs*) na manutenção dos parâmetros de motilidade dos espermatozoides refrigerados a 5°C por meio da proteção da membrana espermática contra o choque térmico.

As arilsulfatases (Arylsulfatase) são proteínas que foram encontradas no plasma seminal de diferentes espécies, incluindo o cão, e que estão relacionadas com a capacitação espermática e com a deterioração mais acelerada em células espermáticas preservadas em plasma seminal (GADELIA et al., 1991).

A lactoferrina (*Lactoferrin*) foi descrita no plasma seminal canino e, a despeito de que ainda não tenha sido elucidado seu papel nesta espécie, é uma proteína homóloga a transferrina (*Transferrin*), que é secretada pelas células de sertoli (HOLMES et al., 1984; SKINNER, GRISWOLD, 1980) e tem papel importante no fornecimento de ferro para as células germinativas em desenvolvimento, sendo um importante indicador da função gonadal em humanos (BARTHLEMY et al., 1988; FORESTA et al., 1986) e touros (GILMONT et al., 1990). Entretanto, Kikuchi et al. (2003) relacionaram a lactoferrina e não a transferrina com a concentração espermática de cães.

A ação da enzima superóxido desmutase (*superoxid desmutase - SOD*) foi comprovada no plasma seminal de cães, sendo considerada importante para a proteção dos espermatozoides contra as espécies reativas de oxigênio (EROS) pelo o sistema de antioxidação enzimática (CASSANI et al., 2005). A catalase (CAT) também foi detectada no plasma seminal de cães, mas em menor quantidade, e quando teve seus efeitos comparados aos do superóxido desmutase, foi considerada menos importante para a proteção dos

espermatozoides contra os ROS (KAWAKAMI et al., 2006).

Em outro estudo, foi realizada a concentração de fosfatase ácida (*Acid Phosphatase - AP*), antígeno prostático específico (*Prostate Specific Antigen - PSA*) e arginina esterase prostática canina (*Canine Prostate Specific Esterase - CPSE*) no soro e plasma seminal de animais saudáveis e com hiperplasia prostática benigna, prostatite bacteriana e carcinoma prostático a fim de determinar se estas proteínas poderiam ser um marcador para detecção dessas afecções prostáticas. Verificou-se que estas proteínas podem ser detectadas no soro de animais acometidos por patologias prostáticas, sobretudo no caso de com hiperplasia prostática benigna. Não foi possível, contudo, correlacionar a concentração das proteínas com o carcinoma prostático, ou por ação das atividades das células cancerígenas sobre as proteínas ou pelo baixo número de animais testados no experimento (FORD et al., 1995). Entretanto, Amorim et al. (2004) conseguiram associar os índices de fosfatase ácida prostática (prostatic acid phosphatase - PAP) e do antígeno específico prostático (prostatic specific antigen - PSA), presentes no soro e urina de cães, com lesões prostáticas morfológicas, podendo ser usados como biomarcadores para este fim. .

Proteínas com ação enzimática como a *matrix metalloproteinase 2* (MMP-2) e a *matrix metalloproteinase 9* (MMP-9) foram detectadas no plasma seminal canino e relacionadas com elevada qualidade espermática e a baixa qualidade espermática, respectivamente, embora sua relevância na infertilidade ainda seja incerta (SAEGNSOI, et al., 2011).

Interessantemente, nos cães a expressão de proteínas nas frações do ejaculado canino são diferentes. Na segunda fração, que contém os espermatozoides, e na terceira, cujo conteúdo é prostático, a expressão de proteínas é maior e, embora a maioria das proteínas sejam detectadas em ambas frações, são descritas proteínas exclusivas para a fração rica em espermatozoides, com destaque para as proteínas *UPF0764 protein*, *C16orf89 homolog* e *epididymal-specific lipocalin-9* que se mostraram em maior quantidade. Estas proteínas foram correlacionadas com o processo de maturação e desenvolvimento do espermatozoide no epidídimo, e sugeriram que poderiam ser utilizadas como marcadoras de fertilidade. Também foram encontradas proteínas das membranas celulares e citoesqueleto de células espermáticas no plasma

seminal de cães, porém estas podem ser resultantes da ruptura celular resultante do congelamento das amostras durante seu preparo ou mesmo de uma interação fisiológica entre as células espermáticas e o plasma seminal durante a maturação e após a ejaculação (AQUINO-CORTEZ et al., 2017).

2.6.2. Proteínas do fluido epididimário

Martins et al. (2002) estudaram o perfil proteico do fluido epididimário canino e encontraram um padrão semelhante ao verificado no plasma seminal.

A fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase*), e carnitina (*Carnitine*) são duas proteínas encontradas no fluido epididimário, e sua presença no ejaculado de cães azoospermicos é considerada como marcador de obstrução da rede de ductos (JOHNSTON, 1991). Frenette et al. (1986) determinaram que a proteína fosfatase alcalina também presente no plasma seminal, em especial, na primeira fração do ejaculado canino, é originária da cauda do epidídimo, onde foi encontrada em concentração 10 vezes maior do que em outras partes do epidídimo. Isto demonstra que essa proteína está de alguma forma ligada à atividade de maturação da célula espermática.

A carnitina, por sua vez, está envolvida na beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos, atuando tanto na manutenção da membrana plasmática como na viabilidade das células espermáticas (ZOU et al., 2017).

Por meio de análise histoquímica Sinowatz et al. (1979) determinou a localização de quatro glicosidases (*Glycosidases*) no epidídimo canino. A β -Galactosidase mostrou-se presente ao longo de todo epidídimo e a β -N-Acetylglucosaminidase mostrou-se mais presente no corpo e cauda do epidídimo. A β -glucuronidase foi encontrada na cabeça do epidídimo; e α -mannosidase foi encontrada de forma discreta no corpo do epidídimo. Os autores relacionaram a ação destas enzimas à absorção de macromoléculas oriundas de espermatozoides mortos.

Também por análise histoquímica, Domeniconi et al. (2008), observaram pela primeira vez a aquaporina (*Aquaporin - AQP*) tipo AQP2 e AQP7 no epidídimo de mamíferos. Ito et al. (2008) determinaram a presença de aquaporina tipo AQP1 no espermatozoide canino e também no testículo canino através de análise com RT-PCR e anticorpos específicos pra AQP1. Foi postulado que a

aquaporina pode estar envolvida com o fluxo de água durante a criopreservação dos espermatozoides.

Beiglbök et al. (1998) verificaram que o mRNA de tamanho 1.5 kb, específico do epidídimo canino, codifica a proteína secretora tipo glutathione peroxidase, GPX5. As glutathione peroxidases (*Glutathione peroxidases* - GPXs) tem a função de proteger células e biomoléculas sensíveis como DNA, proteínas e lipídios de lesão oxidativa.

2.6.3. Proteínas da célula espermática

Raros estudos foram conduzidos a respeito do proteoma das células espermáticas de cães, apesar de estudos de proteínas isoladas (AQUINO-CORTEZ et al., 2017). A glutathione (*Glutathione*) e as enzimas glutathione redutase e peroxidase (*Glutathione reductase, peroxidase*) foram descritas, sugerindo a possibilidade de que as mesmas atuem como mecanismo protetor contra os processos oxidativos no espermatozoide, os quais podem causar lesões na membrana plasmática, da mesma forma com que atuam em outros tipos celulares (LI, 1975).

Torres et al. (2017) descreveram a presença da proteína no espermatozoide canino, sugerindo sua participação no processo de capacitação espermática, uma vez que os canais de panexina (*Panexine*) atuam de forma não seletiva para a passagem de íons como cálcio e potássio.

A relaxina (*Relaxine*) e seus receptores RXFP1 e RXFP2 foram isoladas em espermatozoides de cães adultos por Almeida et. al. (2016), contudo, sua função na fertilidade espermática permanece incerta.

Sabeur, et al. (2002) evidenciaram a presença da proteína hialuronidase PH-20 (*Hyaluronidase PH-20*) na membrana plasmática dos espermatozoides e também em espermátides caninas, sendo que sua atividade de ligação celular mostrou-se mais pronunciada quando em pH ácido.

Cheema et al. (2013) demonstraram em cães que as proteínas de superfície espermática hialuronidase PH-20, também chamada de molécula de adesão espermática-1 (*Sperm Adhesion Molecule 1 / SPAM-1*), localizadas principalmente na cabeça do espermatozoide, e a lactato desidrogenase 4 (*Lactate dehydrogenase C4 / LDH-C4*), localizada principalmente nas regiões pós-acrossomal e da peça intermediária dos espermatozoides, possuem propriedades

imun contraceptivas que podem ser exploradas.

Fernandez-Novell et al. (2004) testaram a atividade de uma hexoquinase de alta Km (*High-Km Hexokinase*) no espermatozoide canino, e verificaram a presença de uma atividade específica exercida por uma proteína tipo glucoquinase do espermatozoide canino (*Dog-Sperm Glucokinase-Like Protein - DSGLP*) no intervalo de 4–10 mM da concentração de glicose. Apesar de não se saber o papel fisiológico exato ou mecanismos de controle desta proteína, os autores acreditam que ela será de grande valia no controle e manutenção energético do ejaculado canino.

2.6.4. Vacinas contraceptivas

O método escolhido para o controle populacional de uma determinada espécie depende de diferentes fatores como segurança, eficiência, custo e consequências ambientais (BARFIELD et al., 2006; FERRO, MORDINI, 2004). Neste contexto, as vacinas contraceptivas têm sido propostas como alternativa mais rápida, barata e menos invasiva do que os procedimentos cirúrgicos para a esterilização. O ideal é que produza efeitos de longo prazo, reversível ou não, sem causar prejuízo a saúde e produzindo resultados restritos às funções reprodutoras do animal (NAZ, 2011b).

Vacinas contraceptivas vem sendo testadas desde os anos 1980 e seu desenvolvimento esbarra em problemas como: a necessidade de várias aplicações, variabilidade entre as respostas imunes de cada indivíduo, diminuição da resposta imune com o passar do tempo tornando o animal fértil novamente e efeitos colaterais provocados pelo uso de adjuvantes (MUNKS, 2012). Não obstante, as vacinas contraceptivas induzem resposta imune, humoral ou celular, contra moléculas inerentes aos indivíduos que se pretende imunizar, incluindo proteínas da superfície celular de espermatozoides e óvulos e hormônios relacionados à reprodução (KIRKPATRICK et al., 2011; ALEXANDER, BIALY, 1994; DELVES, et al. 2002).

Esta resposta imune pode resultar em interferência na produção e função de gametas e na implantação do zigoto. Quando a interferência pretendida se dá na implantação do zigoto, é preferível usar o termo vacina de controle de natalidade ao invés de vacina contraceptiva (FIGURA 7; NAZ, 2005; FERRO, MORDINI, 2004).

A vacina baseada em hCG é um exemplo de vacina de controle de natalidade, tendo seu uso restrito a primatas (FERRO, MORDINI, 2004). Existe ainda a possibilidade de se utilizar uma vacina contraceptiva baseada na proteína carreadora de riboflavina (RCP), que é a principal mediadora para os suprimentos vitamínicos do feto em mamíferos. Esta proteína é produzida no testículo e é encontrada no acrossoma dos espermatozoides (BHAT et al., 1995). Tais vacinas mostraram-se capazes de interferir na viabilidade embrionária antes e durante os estágios de peri-implantação embrionária em ratos (MURTY, ADIGA, 1982) e macacos (SESHAHIRI, ADIGA, 1987), e também influenciar negativamente a capacidade de fertilização do espermatozoide de ratos e macacos (SRIDHAR et al., 1996).

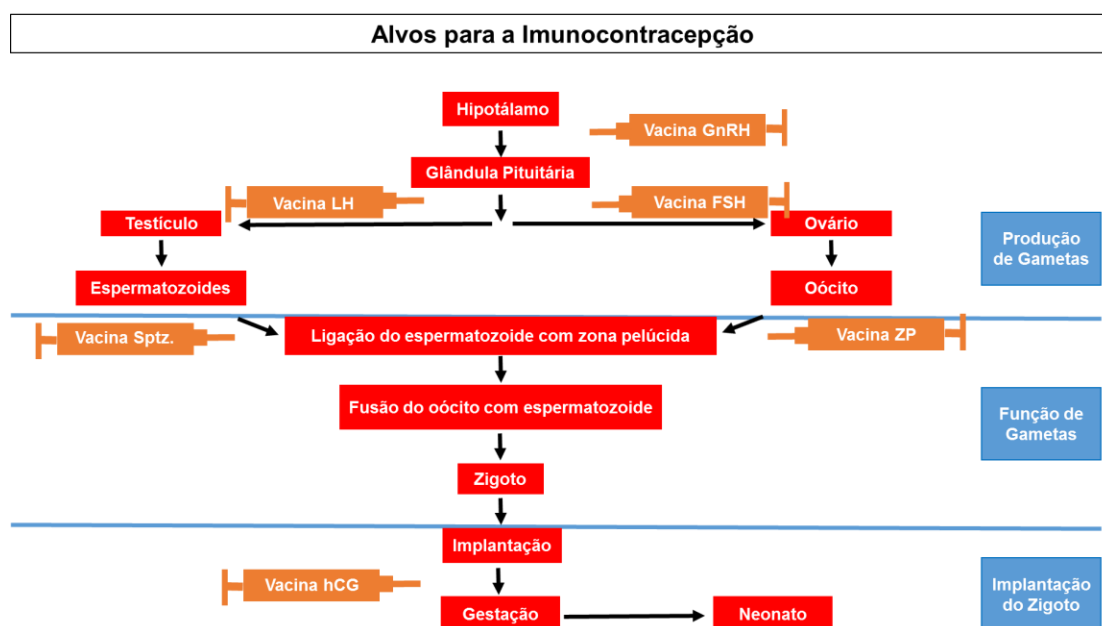


Figura 7 – Esquema demonstrando os vários momentos e alvos que podem ser explorados no desenvolvimento de vacinas contraceptivas.

Por afetarem a produção de esteroides, as vacinas baseadas em GnRH tem aplicação limitada em humanos, que precisariam de suplementação hormonal para manter a libido e características sexuais secundárias (LADD et al., 1998). Em animais, onde este tipo de preocupação é menor, esta forma de vacina tem obtido resultados promissores a curto prazo, (JUNG et al, 2005), embora sua eficácia dependa de diferentes fatores como espécie e homogeneidade genética

da população, limitando o sucesso do procedimento. Ratos e carneiros, por exemplo, apresentaram queda de 30-40% na espermatogênese após a vacinação, enquanto que cães tiveram redução de apenas 5% (FERRO et al, 2004). Da mesma forma, vacinas baseadas em FSH ou em seus receptores, também se mostraram capazes de produzir oligoespermia em macacos (MOUDGAL, DIGHE, 1999), mas sua baixa eficiência em produzir azospermia desencoraja a sua utilização.

Vacinas baseadas em LH e seus receptores, interferem negativamente tanto na produção de gametas quanto esteroides, tendo seus efeitos reversos com a queda da titulação de anticorpos, como demonstrado em cães machos (LADD et al., 1994), cadelas (SAXENA et al., 2002) e gatas (SAXENA et al., 2003). Entretanto os efeitos podem ser permanentes a depender da espécie, como em coelhos machos, onde houve redução da pituitária e atrofia testicular (ARIMURA et al., 1974) ou ainda não produzir anticorpos como no caso de gatos machos (LADD et al., 1994).

Em fêmeas, podem ser utilizadas vacinas baseadas em antígenos da zona pelúcida, que é uma estrutura protetora que envolve o óócito de mamíferos e é responsável pela ligação do espermatozoide ao oócito, pela indução da reação acrossômica no espermatozoide ligado à zona pelúcida e ainda prevenção da polispermia. A zona pelúcida é composta por 3 glicoproteínas: ZP1, ZP2 e ZP3 (WASSARMAN, 1988). Devido a facilidade de encontrar ovários suínos em abatedouros, antígenos provenientes desta espécie são frequentemente utilizados para induzir contracepção em diferentes espécies (GUPTA et al., 2004). Apesar disso, as glicoproteínas da zona pelúcida formam uma barreira preventiva frente a fertilização interespecíes, o que explica a dificuldade de se utilizar, em alguns casos, antígenos de uma espécie em outra, como no caso de gatos. A pequena disponibilidade de ovários de cães e gatos a disposição para se obter e purificar as proteínas da zona pelúcida pode dificultar a implantação desta vacina em pequenos animais, o que pode requerer o uso de vacinas de DNA para expressar os antígenos pretendidos e elucidar a questão (EADE et al, 2009).

Vacinas produzidas contra um antígeno espermático também podem ser usadas em fêmeas, visando provocar a secreção de anticorpos no trato genital

feminino, a fim de se obter contracepção com menor risco de desenvolvimento de uma resposta autoimune (DELVES et al., 2002).

No macho, uma vacina produzida contra um antígeno espermático deve ser capaz de reagir com o espermatozoide pós-testicular. Os anticorpos antiespermatozoides podem entrar no trato genital masculino via *rete testis* e próstata, permitindo o uso de vacinas que inativem os espermatozoides sem danos teciduais (JONES, 1996). O alto número de células espermáticas a serem neutralizadas representam um claro desafio a este método de contracepção em machos (DELVES et al., 2002). Mesmo assim, é sabido que, em casais inférteis humanos, de 2-30% dos parceiros independentemente de sexo possuem anticorpos antiespermatozoides e o mesmo acontece com homens que passaram por vasectomia (LINSKIN et al., 1983; KRAUSE, NAZ, 2009)

Sauber et al. (2002), identificaram a PH-20 (hialuronidase), uma proteína localizada na região da cabeça de células com acrossomo intacto, e que, possivelmente está envolvida no processo de fertilização. Sua função foi relacionada à penetração das células do cumulus e ligação à zona pelúcia, como já descrito em outras espécies (GMACHL et al., 1993, MEYERS et al., 1997). Em cobaios, Primakoff et al. (1988) obtiveram sucesso vacinando machos e fêmeas com a PH-20. Os animais imunizados apresentaram soro com altos títulos de anticorpos anti-PH-20, os quais reconheceram extratos espermáticos e bloquearam *in vitro* a adesão dos espermatozoides à zona pelúcida. Os títulos permaneceram altos por períodos de seis a 15 meses. Apesar das evidências, ainda não há estudos a respeito do potencial contraceptivo da PH-20 na espécie canina.

A proteína recombinante P26h (Surface sperm protein P26h) foi utilizada na imunização de hamsters, resultando em redução do número de fetos viáveis e diminuição do número de espermatozoides ligados à zona pelúcida no teste de ligação espermática em oócitos homólogos. Baseado nestes resultados, concluiu-se que esta proteína tem potencial para ser utilizada como contraceptivo (DUBÉ et al., 2005).

Outro estudo, conduzido em homens férteis e inférteis, identificou imunoreatividade específica contra as proteínas de 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 69 kDa, 72 kDa and 85 kDa no soro e para as proteínas 59 kDa e 72 kDa no plasma

seminal, as quais são as principais envolvidas na resposta imune (PARADISI et al., 1995).

A LDH-C4 (isoforma testicular da L-lactate dehydrogenase) é relacionada a motilidade espermática em várias espécies, sendo uma proteína específica do testículo (GOLDBERG, HERR, 1999). Quatro experimentos utilizando vacinas com estas proteínas em babuíños foram conduzidos, obtendo contracepção reversiva em 63 a 75% dos animais tratados (GOLDBERG, WHEAT, 1981; GOLDBERG, SHELTON, 1986; O'HERN et al., 1997; O'HERN, GOLDBERG, 1993).

Muitas são as opções de antígenos para a produção de vacinas contraceptivas, mas apesar de muitos deles terem gerado resultados positivos em diferentes estudos, sua eficácia ainda é inferior à dos contraceptivos de uso corrente. No entanto, a perspectiva de se encontrar uma vacina eficiente é real, e a concretização desta meta está mais perto a cada pesquisa realizada.

Referências¹

ALEXANDER, N.J., BIALY, G. Contraceptive vaccine development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.6, p.273-80, 1994.

ALMEIDA, I. L. G.; DURFEY, C. L.; GASTAL, G. D. A.; DEVOS-BURNET, D.; WILLARD, S.T.; RYAN, P. L.; FEUGANG, J. M. 134 Relaxin and its receptors in mature canine spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, p.175-175, 2016.

AMORIM, L.; MOURA, V.M.B.D; DI SANTIS, G.W., BANDARRA, E.P.; PADOVANI, C. Serum and urinary measurements of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostatic specific antigen (PSA) in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, p.320-324, 2004.

ANDERSON, N.L.; ANDERSON, N.G. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis**, v.19, p.1853-1861, 1998.

AQUINO-CORTEZ, A.; PINHEIRO, B.Q.; LIMA, D.B.C.; SILVA, H.V.R.; MOTA-FILHO, A.C.; MARTINS, J.A.M.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; MOURA, A.A.; SILVA, L.D.M. Proteomic characterization of canine seminal plasma. **Theriogenology**, v.95, p.178–186, 2017.

¹ Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT 2019

ARIMURA, A., SATO, H., KUMASAKA, T., WOROBEK, R.B., DEBELJUK, L., DUNN, J., SCHALLY, A. V. Production of antiserum to LH-releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH. **Endocrinology**, v.94, 1974, p.1264, 1974.

BARFIELD, J.P., NIESCHLAG, E., COOPER, T.G. Fertility control in wildlife: humans as a model. **Contraception**, v.73, p.6-22, 2006.

BARTHELEMY, C. KHALFOUN, B, GUILLAUMIN, J.M., LECOMTE, P., BARDOS, P. Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. **Journal of reproduction and fertility**, v.82, p. 113-8, 1988.

BEIGLBÖCK, A.; PERA, I; ELLERBROCK, K; KIRCHHOFF, C. Dog epididymis-specific mRNA encoding secretory glutathione peroxidase-like protein. **Journal of reproduction and fertility**. v.112, p.357-67, 1998.

BHAT, K.G., MALHOTRA, P., KARANDE, A.A., ADIGA, P.R. Immunohistochemical localization of riboflavin carrier protein in testicular cells of mammals. **Indian journal of experimental biology**, v.33, p.12–16, 1995.

BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; ARAÚJO, L.R.S.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; QUEVEDO FILHO, I.B.; MOURA, A.A.A.; TONIOLLI, R. O estudo proteômico e o seu potencial de avaliação da fertilidade em machos de diferentes espécies domésticas. **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 3, p. 266-271, 2013.

BARUAH, K.K.; DHALI, A.; BORA, B.; MECH, A.; MONDAL, M. Detection of osteopontin transcript in seminal plasma and its association with post-freeze-thaw quality of cryopreserved spermatozoa in mithun (*Bos frontalis*). **Indian Journal Of Animal Research**, v.51, p.648-653, 2017.

BRANDON; C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-73, 1999.

BUTLER, J.R.A.; DU TOIT, J.T. Diet of free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) in rural Zimbabwe: implications for wild scavengers on the periphery of wildlife reserves. **Animal Conservation**, v.5, p. 29-37, 2002.

BUTLER, J.R.A.; DU TOIT, J.T.; BINGHAM, J. Free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators and prey in rural Zimbabwe: threats of competition and disease to large wild carnivores. **Biological conservation**, v.115, p. 369-378, 2004.

CALVETE, J.; SANZ, L.; REINERT, M.; DOSTALOVA, Z.; TOPFER-PETERSEN, E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 166, p. 515-524, 1995.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bull. **Biology of Reproduction**, v.57,

p.1293-301, 1997.

CASSANI, P.; BECONI, M.T.; O'FLAHERTY, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.163–173, 2005.

CHAPDELAINE, P.; DUBÉ, J.Y.; FRENETTE, G.; TREMBLAY, R.R. Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. **Journal of Andrology**, v.5, p.206-10, 1984.

CHEEMA, R.S.; BHAKRI, G.; GANDOTRA, V.K.; DHANJU, C.K. Characterization of mongrel dog seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. **Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology** (Suppl) v. 2, n. 1, p. 55-63, 2011.

CHEEMA, R.S.; VASHISHT, N.; BHAKRI, G.; GANDOTRA, V.K. Molecular characterization and immunolocalization of sperm surface proteins (SPAM-1 and LDH-C4) in dog. **Animal Science Reporter**, v.7, p.96-106, 2013.

DELVES, P.J.; LUND, T.; ROITT, I.M. Antifertility vaccines. **Trends in Immunology**, v.23, p.213-219, 2002.

DONAVAN, C.; GREER, M.; KUTZLER, M. Physiologic responses following gonadotropin-releasing hormone immunization in intact male dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.403–405, 2012.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; JUSTULIN, L.A.; BEU, C.C.L.; FELISBINO, S.L. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. **Cell Tissue Research**, v.332, p.329–335, 2008).

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

DUBÉ, J. Y. Prostatic kallikreins: biochemistry and physiology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.107c, p.13-20, 1994.

DUBÉ, J.Y.; CHAPDELAINE, P.; TREMBLAY, R.R. Effect of testicular hormones on synthesis of soluble proteins by dog prostate slices. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 61, p.756–763, 1983.

DUBÉ, J.Y., LAZURE, C., TREMBLAY, R.R. Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. **Clinical and investigative medicine**, v.9, p.51-54, 1985.

DUBÉ, E.; LEGARE, C.; GAUDREAU, C.; SULLIVAN, R. Contraceptive responses of female hamsters immunized with recombinant sperm protein P26h. **Contraception**, v. 72, p. 459–467, 2005.

EADE, J.A., ROBERSTON, I.D., JAMES, C.M. Contraceptive potential of porcine and feline zona pellucida A, B and C subunits in domestic cats. **Reproduction**, v.137, p.913-922, 2009.

EL-HAGGAR, S.; RASHED, L.; SALEH, N.Y.; TAYMOUR, M.; MOSTAFA, T. Seminal osteopontin relationship with semen variables in infertile men with varicocele. **Human Andrology**, v. 3, p.90–93, 2013.

ENGLAND, G.C.W., **Dog breeding, whelping and puppy care**. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. p. 340.

ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E., MIDDLETON, D.J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. **Research in Veterinary Science**, v.49, p.66–70, 1990.

ENGLAND, G.C.W., BURGESS, C.M., FREEMAN, S.L., PACEY, A.A. Relationship between the fertile periods and sperm transport in the bitch. **Theriogenology**, v.66, p.1410–1418, 2006.

ENGLAND, G.C.W., RUSSO, M., FREEMAN, S.L. The bitch uterine inflammatory response to mating and its modification by male accessory gland secretion. **The Veterinary Journal**, v.195, p.179–184, 2013.

FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V.; HEIDGER, P.M. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **Journal of reproduction and fertility**. Supplement. V.10, p.105-122, 1970.

FAWCETT, D.W.; NEAVES, W.B.; FLORES, M.N. Comparative observations on the intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v.9, p.500-532, 1973.

FERNANDEZ-NOVELLA, J.M.; BALLESTER, J.; MEDRANO, A.; OTAEGUI, P.J.; RIGAU, T.; GUINOVART, J.J.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. **FEBS Letters**, v.570, p.211–216, 2004.

FORD, W.B.; BELL, W.; KLAUSNER, J.S.; HAYDEN, D.W.; LUND, E.M.; LIEBENSTEIN, B.B.; FEENEY, D.A.; JOHNSTON, S.D.; SHIVERS, J.L.; EWING, C.M.; ISAACS, W.B. Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.9, p.149-153, 1995.

FORESTA, C., MANONI, F., BUSINARO, V., DONADEL, C., INDINO, M., SCANDELLARI, C. Possible significance of transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v.7, p.77-82, 1986.

FERRO, V., KHAN, M.A., MCADAM, D., COLSTON, A., AUGHEY, E., MULLEN, A., WATERSTON, M.M., HARVEY, M.J. Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) - a histological comparison in male animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.73-86, 2004.

FERRO, V.A., MORDINI E. Peptide vaccines in immunocontraception. **Current opinion in molecular therapeutics**, v.6, p.83-89, 2004.

FOOTE, R.H.; SWIERSTRA, E.E.; HUNT, W.L. Spermatogenesis in the Dog. **Anatomical Record**, v.173, p. 341-352, 1972.

FRENETTE, G.; DUBÉ, J. Y.; LACOSTE, D.; TREMBLAY, R.R. Radioimmunoassay in blood plasma of arginine esterase: the major secretory product of dog prostate. **Prostate**, v. 10, p. 145-152, 1987.

FRENETTE, G.; DUBÉ, J.M.Y.; TREMBLAY, R.R. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. **Archives of Andrology**, v.16, p.235-241, 1986.

FRENETTE, G.; DUBÉ, J.Y.; TREMBLAY, R.R. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. **Archives of Andrology**, v.16, p.235-241, 1986.

GADELIA, B.M., COLENBRANDER, B; LOPES-CARDOZO, M. Arylsulfatases Are Present in Seminal Plasma of Several Domestic Mammals. **Biology of Reproduction**, v.45, p.381-386, 1991.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. (Ed.) **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. P.97-110.

GILMONT, R.R.; SENGHER, P.L.; SYLVESTER, S.R.; GRISWOLD, M.D. Seminal Transferrin and Spermatogenic Capability in the Bull. **Biology of reproduction**, v.43, p.151-157, 1990.

GMACHL, M.; SAGAN, S.; KETTER, S.; KRCIL, G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. **FEBS Letters**, v. 336, p. 545-548, 1993.

GOLDBERG, E., HERR, J.C. LDH-C4 as a contraceptive vaccine. In: GUPTA, S.K. (Ed.). **Reproductive immunology**, New Delhi: Narosa, 1999. p.309-315.

GOLDBERG, E., SHELTON, J.A. Immunosuppression of fertility by LDH-C4. In: TALWAR, G.P. (Ed.). **Immunological Approaches to Contraception and Promotion of Fertility**. New York: Plenum Publishing Corporation; 1986; 219-230.

GOLDBERG, E., WHEAT, T.E., POWEL, J.E., STEVENS, V. Reduction of fertility in female baboons immunized with lactate dehydrogenase-C4. **Fertility and Sterility**, v.35, p.214-217, 1981.

GRANDAGE, J. The erect dog penis: a paradox of flexible rigidity. **Veterinary Record**, v.91, p.141–7, 1972.

GUPTA, S.K., SRIVASTAVA, N., CHOUDHURY, S., RATH, A., SIVAPURAPU, N., GAHLAY, G.K., BATRA, D. Update on zona pellucida glycoproteins based contraceptive vaccine. **Journal of Reproductive Immunology**, v.62, p.79–89, 2004.

GUYONNET, B.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L; GATTI, J.L. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. **Journal of Andrology**, v.32, p.651-63, 2011.

HENRY, M.; ECHEVERRI, A.M.L. Maturação e capacitação espermática, reação acrossomica e fertilização. In: __. **Andrologia Veterinária Básica**. Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2013. P.81-95.

HO, H.; SUAREZ, S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, p. 519–526, 2001.

HOLMES, S.D., LIPSHULTZ, L.I., SMITH, R.G. Regulation of transferrin secretion by human Sertoli cells cultured in the presence or absence of human peritubular cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.59, p.1058-62, 1984..

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013**. Rio de Janeiro, 2015.

ISAACS, W.B.; COFFEY, D.S. The predominant protein of canine seminal plasma is an enzyme. **Journal of biology chemistry**, v.259, p.11520-11526, 1984.

ITO, J.; KAWABE, M.; OCHIAI, H.; SUZUKAMO, C.; HARADA, M.; MITSUGI, Y.; SEITA, Y.; KASHIWASAKI, N. Expression and immunodetection of aquaporin 1 (AQP1) in canine spermatozoa. **Cryobiology**, v.57, p.312–314, 2008.

JERVIS, K.M.; ROBAIRE, B. Dynamic Changes in Gene Expression along the Rat Epididymis. **Biology of Reproduction**. v. 65, p. 696-703, 2001.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v.48, p.1199-1216, 1997.

JOHNSTON, S.D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 21, p. 545-51, 1991.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRIZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: Saunders. 2001. 592 p.

JONES, R.C.; MURDOCH, R.N. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 553–568, 1996.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538 p.

KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; TAKANO, M.; HIRANO, T.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic beagles. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, p.133–136, 2007.

KIKUCHI, M.; MIZOROKI, S.; KUBO, T.; OHWA, Y.; KUBOTA, M.; YAMADA, N.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Seminal Plasma Lactoferrin but Not Transferrin Reflects Gonadal Function in Dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.679–684, 2003.

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

KIRKPATRICK, J.F.; LUDA, R.O.; FRANK, K.M. Contraceptive vaccines for wildlife: a review. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.66, p.40-50, 2011.

KRAUSE, W.K.H., NAZ, R.K. (Eds): **Immune Infertility**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 2009; pp. 1–236.

KUTZLER, M.A. Semen collection in the dog. **Theriogenology**, v.64, p.747–754, 2005.

LADD, A., PRABHU, G., TSONG, Y.Y., PROBST, T., CHUNG, W., THAU, R.B. Active immunization against gonadotropin-releasing hormone combined with na complementary androgen supplementation is a promising antifertility vaccine for males. **American journal of reproductive immunology and microbiology**, v.17, p.121-7, 1998.

LADD, A., TSONG, Y.Y., WALFIELD, A.M., THAU, R. Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. **Biology of reproduction**, v.51, p.1076-1083, 1994.

LISKIN L., PILE, J.M., QUILLAN, W.F. Vasectomy safe and simple. **Population Reports**, v.4, p.61–100, 1983.

Li, T. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biology of reproduction**, v.12, p.641-646, 1975.

LIMA, A.F.M.; PARDINI, L.; LUNA, S.P.L. Avaliação de sobrevivência, alterações genitourinárias, comportamentais e de peso corpóreo no pós-operatório tardio em cadelas e gatas submetidas a ovariosalpingohisterectomia sob diferentes métodos de ligadura do pedículo ovariano. **ARS Veterinária**, v.26, p.60-65, 2010.

LESSA, I.; GUIMARÃES, T.C.S.; BERGALLO, H. G.; CUNHA, A.; VIEIRA, E.M. Domestic dogs in protected areas: a threat to Brazilian mammals? **Brazilian Journal of Nature Conservation**, v.14, p.46–56, 2016.

MANJUNATH, P., THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-19, 2002.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade na função testicular de cães**. 2005. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária [Botucatu]), Universidade Estadual Paulista Júlio, UNESP, Botucatu.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Eletroforese das proteínas do fluido epididimal canino: Dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 72-75, 2002.

McENTEE, M.; ISAACS, W.; SMITH, C. Adenocarcinoma of the canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. **Prostate**, v. 11, p. 163-170, 1987.

MEEUSEN, E. N. T.; WALKER, J.; PETERS, A.; PASTORET, P.; JUNGENSEN, G. Current status of veterinary vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 489–510, 2007.

MEYERS, S. A.; YUDIN, A. I.; CHERR, G. N.; VANDE VOORT, C. A.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P.; OVERSTREET, J. W. Hyaluronidase activity of macaque sperm assessed by an in vitro cumulus penetration assay. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 392-400, 1997.

MOGIELNICKA-BRZozowska, M.; DZIEKOŃSKA, A.; STRZEŻEK, R.; ZAŁĘCKI, M.; MAJEWSKA, A.; TOŁŚCIK, K.; KORDAN, W. Effect of seminal plasma zinc-binding proteins on motility and membrane integrity of canine spermatozoa stored at 5°C. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.58, p.163-168, 2014.

MOGIELNICKA-BRZozowska, M.; FRASER, L.; CZARZASTA, J.; KORDAN, W. Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 3, p. 493-498, 2012.

MOUDGAL, N.R., DIGHE, R.R. Is FSH-based contraceptive vaccine a feasible proposition for the human male? In: GUPTA, S.K, (Ed). **Reproductive immunology**. New Delhi: Narosa Press, 1999, p.346-57.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.25, p.747–806, 2004.

MURTY, C.V.R., ADIGA, P.R. Pregnancy suppression by active immunization against gestation-specific riboflavin carrier protein. **Science**, v.216, p.191–193, 1982.

NASS, S.J., STRAUSS, J.F. Strategies to facilitate the development of new contraceptives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p.885-890, 2004.

NATOLI, E.; MARAGLIANO, L.; CARIOLA, G.; FAINI, A.; BONANNI, R.; CAFFAZZO, S.; FANTINI, C. Management of feral domestic cats in the urban environment of Rome (Italy). **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p. 180–185, 2006.

NAZ, R. K. Antisperm contraceptive vaccines: where we are and where we are going? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, n. 1, p. 5-12, 2011a.

NAZ, R.K. Contraceptive vaccines: success, status, and future perspective. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.66, p.2- 4, 2011b.

NAZ, R.K. Contraceptive Vaccines. **Drugs**, v.65, p.593-603, 2005.

O'HERN, P.A., GOLDBERG, E. Development of a contraceptive peptide vaccine for use with PGAL microspheres. In: **Proceedings of the international symposium on controlled release of bioactive materials**, Controlled Release Society, 1993, p.394-395.

O'HERN, P.A., LIANG, Z.G., BAMBRA, C.S., GOLDBERG, E. Colinear synthesis of an antigenspecific B-cell epitope with a "promiscuous" tetanus toxin T-cell epitope: a synthetic peptide immunocontraceptive. **Vaccine**, v.35, p.1761-1766, 1997.

PALMER, C.; PEDERSEN, H.G.; SANDOE, P. Beyond castration and culling: should we use non-surgical pharmacological methods to control the sexual behavior and reproduction of animals? **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v.31, p.197–218, 2018.

PARADISI, R.; PESSION, A.; BELLAVIA, E.; FOCACCI, M.; FLAMIGNI, C. Characterization of human sperm antigens reacting with antisperm antibodies from autologous sera and seminal plasma in a fertile population. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 28, p. 61-73, 1995.

PERO, M.E.; KILLIAN, G.J.; LOMBARDI, P.; ZICARELLI, L.; AVALLONE, L.; GASPARRINI, B. Identification of osteopontin in water buffalo semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.279, 2006.

PRIMAKOFF, P.; LATHROP, W.; BRONSON, R. Identification of human sperm surface glycoproteins recognized by autoantisera from immune infertile men, women, and vasectomized men. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 929–942, 1990.

PRIMAKOFF, P.; LATHROP, W.; WOOLMAN, L.; COWAN, A.; MYLES, D. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. **Nature**, v. 335, p. 543-546, 1988.

RAHME, L.S.T.R.; HENRY, M. Anatomia do espermatozoide e fisiologia do movimento. In: HENRY, M.; ECHEVERRI, A.M.L. **Andrologia Veterinária Básica**. Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2013. P.73-79.

REECE, J.F.; CHAWLA, S.K.; HIBY, E.F.; HIBY, L.R. Fecundity and longevity of roaming dogs in Jaipur, India. **BMC Veterinary Research**, v.4, p1-7, 2008.

REESE, J.F. Dogs and dog control in developing countries. In: D.J. Salem & A.N. Rowan (Eds.). **The state of the animals III**. Washington, DC: Humane Society Press, p. 55-64, 2005.

SABEUR, K.; FORISTALL, K.; BALL, B.A. Characterization of PH-20 in canine spermatozoa and testis. **Theriogenology**, v.57, p.977-987, 2002

SAENGSOI, W.; SHIA, W.Y.; SHYU, C.L.; WU, J.T.; WARINRAK, C.; LEE, W.M.; CHENG, F.P. Detection of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in canine seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.114–119, 2011.

SAUBER, K.; FORISTALL, K.; BALL, B.A. Characterization of PH-20 in canine spermatozoa and testis. **Theriogenology**, v.57, p. 977-987, 2002.

SAXENA, B.B., CLAVIO, A., SINGH, M., RATHNAM, P., BUKHAROVICH, Y., REIMERS, T., SAXENA, A., PERKINS, S. Modulation of ovarian function in female dogs immunized with bovine luteinizing hormone receptor. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.9–17, 2002.

SAXENA, B.B., CLAVIO, A., SINGH, M., RATHNAM, P., BUKHAROVICH, E.Y., REIMERS, T.J., SAXENA, A., PERKINS, S. Effect of immunization with bovine luteinizing hormone receptor on ovarian function in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, p.292–298, 2003.

SCHILLER, J. Immunological approaches to sterilization of cats and dogs. In: 4th International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control, Alliance for Contraception in Cats & Dogs - ACCD, Dallas, Texas, USA. **Proceedings ...**, 2010. p.1-9.

SESGHAGIRI, P.B., ADIGA, P.R. Pregnancy suppression in the bonnet monkey by active immunization with the chicken riboflavin carrier protein. **Journal of Reproductive Immunology**, v.12, p.93–107, 1987.

SINOWATZ, F.; FISCHER, M.; SKOLEK-WINNISCHT, R.; CHANDLER, J.A. Histochemical localization of glycosidases in dog epididymis. **Histochemical Journal**, v.11, p.103-109, 1979.

SKINNER, M.K., GRISWOLD, M.D. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.9523-5, 1980.

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

SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise**

bioquímica do plasma seminal canino (Electrophoretical characterization of protein profile and biochemistry analysis of canine seminal plasma). Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, Brazil, 98p, 2003.

SOUZA, F.F.; BARRETO, C.S.; LOPES, M.D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. **Theriogenology**, v. 68, p. 100–106, 2007.

SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.; LOPES, M.D. Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, Supplement 2, p.283–286, 2009.

SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; LOPES, M.D. Correlation of canine seminal plasma and sperm membrane proteins with seminal parameters and in vitro fertility. In: **Proceedings of the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress**, 2008 - Vienna, Austria. p. 1-2.

SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Massa molar das proteínas do plasma seminal canino: dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 75-77, 2002.

SOUZA, F.F.; MARTINS, M.I.M.; FERNANDES, C.E.S.; RIBOLLA, P.E.M.; LOPES, M.D. Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. **Theriogenology**, v. 66, p. 1606–1609, 2006.

SRIDHAR, L.; KUMAR, M., ADIGA, P.R. Active immunization with riboflavin carrier protein suppresses fertility in male rodents and monkeys. In: **Discussion Meeting on Perspectives in Biochemistry and Molecular Biology**. [Abstracts] Indian Institute of Science, Bangalore, India. p. 334. 1996.

STOREY, B.T., KAYNE, F.J. Properties of pyruvate kinase and flagellar ATPase in rabbit spermatozoa: Relation to metabolic strategy of the sperm cell. **Journal of Experimental Zoology**, v.211, p.361–367, 1980.

SUAREZ, S.S.; OSMAN, R.A. Initiation of Hyperactivated Flagellar Bending in Mouse Sperm within the Female Reproductive Tract. **Biology of Reproduction**, v.36, p. 1191-1198, 1987.

SURI, A. Contraceptive vaccines targeting sperm. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 5, n. 3, p. 381-392, 2005.

SURI, A. Family of sperm associated antigens: relevance in sperm-egg interaction and immunocontraception. **Society for Reproduction and Fertility**, v. 63, p. 433-443, 2007.

TOPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 159–170, 2005.

TORRES, J. L.; PALOMINO, J.; MORENO, R. D.; DE LOS REYES, M. Pannexin channels increase propidium iodide permeability in frozen-thawed dog spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, p.2269-2276, 2017.

TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction, fertility and development**, v.18, p. 25-38, 2006.

TURNER, R.M. Tales From the Tail: What Do We Really Know About Sperm Motility? **Journal of Andrology**, vol. 24, p.790-803, 2003.

TURNER, T.T. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. **Annals New York Academy of Sciences**. v. 637, p. 364-83. 1991.

WAHEED, M.M.; EL-BAHR, S.M.; AL-HAIDER, A.K. influence of seminal plasma antioxidants and osteopontin on fertility of the arabian horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.705-709, 2013.

WASSARMAN, P.M. Zona pelúcida glycoproteins. **Annual Review of Biochemistry**, v.57, p.415-42,1988.

WOLFSBERG, T.G.; WHITE, J.M. ADAMs in Fertilization and Development. **Developmental biology**, v.180, p. 389-401, 1996.

ZOU, Y., YANG, J., CHANG, S., XU, W., YIN, T., & LONG, W. Acetyl-L-carnitine: an effective antioxidant against cryo-damage on human spermatozoa with asthenospermia. **Current Medical Science**, v.37, p.915–921, 2017.

CAPÍTULO 2

Artigo organizado de acordo com as normas da Revista *Proteomics*, fator de impacto 4,04, exceto as citações no texto

Investigação das proteínas do plasma seminal, fluído epididimário e células espermáticas de cães: a busca de uma proteína contraceptiva

Insights of the seminal plasma, epididymal fluid and spermatozoa proteins of the dogs: search for a contraceptive protein

Otávio Luís de Oliveira Henriques Paulo¹, Pablo Eduardo Ocampo Ortiz¹, Viviana Vallejo Aristizabal¹, Laiza Sartori de Camargo¹, Mayara Travalini de Lima², Camila de Paula Freitas Dell'Aqua¹, Fabiana Ferreira de Souza¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP - Botucatu/SP.

² Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária FMVZ- UNESP - Botucatu/SP.

Correspondencia: Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n - Unesp Campus de Botucatu - Botucatu/SP - CEP 18618-681. E-mail: otavio.l.paulo@gmail.com. Tel/ Fax: +55 14 3815-2343

Palavras-chave: canino/ proteômica/ viabilidade espermática/ contracepção

RESUMO

Vacinas contraceptivas têm sido propostas como uma forma mais rápida e menos invasiva para esterilização de cães. Este estudo objetivou descrever a relação entre as proteínas das células espermáticas ejaculadas e do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário, produzindo base experimental para o design destas vacinas. Para isso, utilizou-se 5 cães ($n = 5$), dos quais foram obtidos o ejaculado e, após a orquiectomia, o produto da recuperação da cauda do epidídimo. As amostras foram submetidas a avaliação da concentração, morfologia, cinética espermática, citometria de fluxo e teste de ligação em membrana perivitelínica de ovo, sendo separadas em 4 grupos: plasma seminal (PS), fluido epididimário (FE), espermatozoides do ejaculado (EJAC) e do epidídimo (EPID). Para análise proteômica a digestão das proteínas dos 4 grupos foi feita *in gel* e avaliadas em espectrômetro de massas Q-Tof. Os parâmetros de motilidade progressiva, retilinearidade, linearidade, coeficiente de oscilação, produção de H_2O_2 e percentagem de membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada foram mais expressivos ($p < 0,01$) no grupo EJAC do que no EPID. Foram encontradas 177 proteínas entre EJAC e PS (16 *up-regulated* no EJAC e 14 no PS); 241 proteínas entre EPID e FE (27 *up-regulated* no EPID e 14 no FE); e 210 proteínas entre EJAC e EPID (3 *up-regulated* no EJAC e 17 no EPID).

1. Introduction

In Brazil, there are 52.2 million dogs and, on average, the ratio is one dog for every six inhabitants (IBGE - Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2015). It is difficult to compute the number of non-domiciled or wandering animals, but it is easy to understand that their overpopulation is a risk both to public health and to the animals themselves that are subject to abuse and food deprivation. (LIMA et al., 2010). Different studies point to the overpopulation of stray animals as an issue of international relevance (BUTLER et al., 2004; BUTLER; DU TOIT, 2002; REECE et al., 2008; REESE, 2005; NATOLI et al. 2006). Thus, birth control of these animals is necessary in order to reduce the consequences of overpopulation.

Surgical sterilization is the most used method, although it is an invasive technique, of high cost and which requires specialized professionals. Thus, contraceptive vaccines have been thought of as a quick, cheap, safe and less invasive alternative when compared to surgical sterilization. Such vaccines, ideally, should produce a long-term immune response, with a minimum of applications, and the possibility of reversion, without harming the animal's health (NAZ, 2011). Therefore, research is being conducted for the vaccine to be able to interfere in the production and function of gametes or even in the implantation of the zygote, whether the female or male is immunized (MEEUSEN et al., 2007; FERRO, MORDINI, 2004).

In the case of the male, the vaccine must be able to react with the post-testicular spermatozoa, which represents a challenge, since we are dealing with millions of cells capable of fertilization that need to be disabled. For this, the hemato-testicular barrier must be overcome without causing tissue

damage. One possible solution is for the antisperm antibodies to be brought to their target via the rete testis and the prostate, leading to the desired contraception (JONES, 1996).

Modern molecular biology techniques, such as the study of the sperm proteome, are being used to produce an experimental basis for the design of molecule inhibitors for contraceptive purposes (SURI, 2005, 2007). In dogs, few studies involving proteins from seminal plasma and sperm membrane have been conducted for this purpose. Thus, this work aims to describe the proteins of epididymal sperm and ejaculate, as well as seminal plasma and epididymal fluid of dogs, seeking, through the correlation between them, to identify one or more possible proteins that result in the production of an efficient contraceptive vaccine.

2. Material and methods

2.1. Reagents

When not mentioned, all reagents used were of high purity and purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden) and Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil).

2.2. Ethical aspects

The ethical aspects recommended by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were considered at each stage of the study, and were approved by the institutional Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA), under protocol 55/2017.

2.3. Animals and experimental design

Five male dogs (*Canis lupus familiaris*) with good body score and age between 1 and 7 years were used in this study, The experimental design followed the flowchart in Figure 1.

After the semen collection (1 sample) the ejaculate was analyzed and the seminal plasma separated by centrifugation, obtaining the seminal plasma (PS) and ejaculate sperm (EJAC) samples. After an interval of 10 to 15 days, dogs were submitted to elective orchiectomy. Immediately after the surgical procedure, epididymal fluid (EF) and epididymal sperm (EPID) were recovered for analysis.

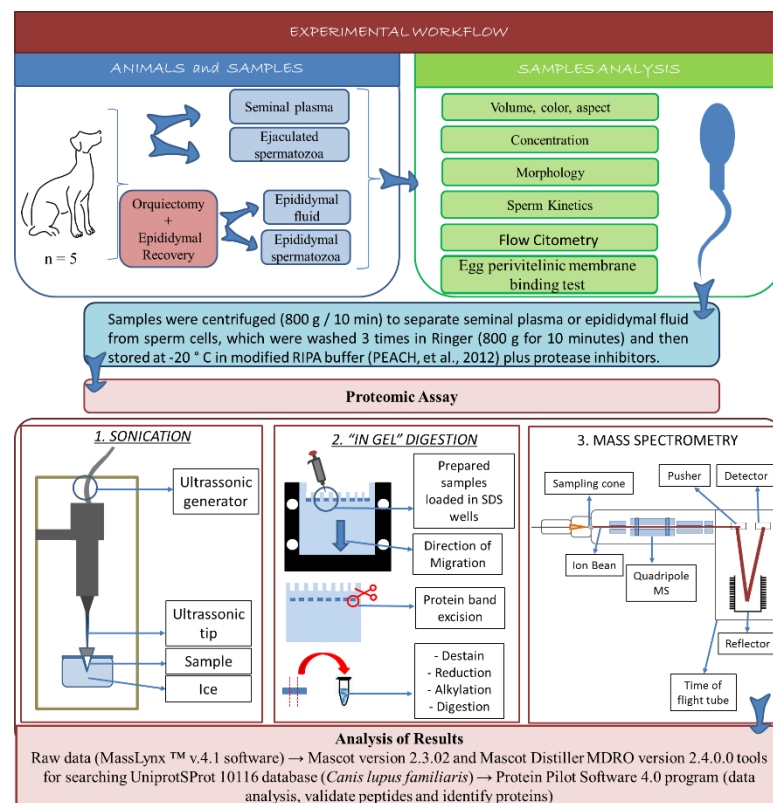


Figure 1. Flowchart of the experiment.

2.4. Semen collection

Before beginning the study, semen was collected for adaptation to

manual collection and disposal of cells stored in the epididymis (~ 3 collections, 2 for depletion and 1 for collection). Semen collection was conducted by digital manipulation of the penis without a female in estrus, using a silicone funnel and graduated plastic tube. To the analysis we manage to collect only the second fraction of the ejaculated.

The sperm from the epididymis were collected after elective orchiectomy, scheduled 10 to 15 days after the semen was collected for the proposed tests. The procedure was performed in an operating room. The anesthetic protocol included pre-anesthetic medication with meperidine (4 mg / Kg) associated with acepromazine (0.03 mg / Kg), followed by induction with ketamine (1 mg / Kg) and propofol (5mg / Kg) with bilateral intratesticular block with lidocaine. After elective orchiectomy, the tail of the epididymis was separated and the cells and fluid were harvested by retrograde flow. For this, a catheter (22g) coupled to a syringe was passed through the vas deferens to wash the compartments with a simple Ringer (5.0 mL / tail of the epididymis), over a 37° C heated Petri dish.

2.5. Semen analysis

After collection, samples were analyzed for volume, sperm concentration, sperm kinetics, morphofunctional analysis (plasma and acrosomal membrane integrity, membrane destabilization and mitochondrial function), generation of free radicals (H_2O_2 and O_2^-), lipid peroxidation and sperm binding test in the egg yolk perivitelline membrane.

The volume was determined by the collection tube graduation. The “Neubauer” hematimetric chamber was used to determine the sperm concentration of the samples, after dilution in buffered formaldehyde in the

proportion of 1: 20. The number of sperm in samples was expressed in millions / mL.

Sperm motility patterns (sperm kinetics) were assessed by Computer-Aided Semen Analyzer (Hamilton-Thorne Computer-Aided Semen Analyzer, CASA System, version 10 Ios, HTR-IVOS 10 Analyzer, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA), according to the setup of the Center for Studies on Animal Reproduction (CERAN, FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil) (Chart 1).

Chart 1. Setup of the Center for Animal Reproduction Studies (CERAN, FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil) for analysis of sperm kinetics.

Image capture	• Frames per second: 60 Hz • Number of frames: 30
Cell detection	• Minimal contrast: 30 • Minimum cell size: 30 pixels
Standarts	• Cell size: 5 pixels • Cell intensity: 40
Progressive cells	• VAP: 70,0 μ/s • STR: 80.0%
Slow cells	• Static, VAP <i>cut-off</i>: 30 μ/s • Static, VSL <i>cut-off</i>: 20 μ/s
Lighting	• Intensity: 3,600 • Otometer: 125
Video source	• Dark field: 60 Hz
Static intensity doors	• Minimum: 0.48 • Maximum: 1.45
Static Elongation Doors	• Minimum: 0 • Maximum: 97
Makler chamber	• Chamber depth: 10.0 μm

	• Stage position: 14.3 mm
Temperature	• 38° C
Field selection	• Automatic

Were assessed spermatozoa total motility (%), progressive motility (%), average speed (VAP - $\mu\text{m} / \text{s}$), linear speed (VSL - $\mu\text{m} / \text{s}$), curvilinear speed (VCL, $\mu\text{m} / \text{s}$), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), head displacement frequency = flagellar beat frequency (BCF, Hz), straightness (STR,%), which indicates the linearity of the average path and is defined as $(\text{VSL} / \text{VAP}) \times 100$, linearity (LIN ,%), which is the relationship between the linear displacement of the sum of the displacements during the measurement time and which is defined as $(\text{VSL} / \text{VCL}) \times 100$, oscillation coefficient (WOB,%) which is $\text{VAP} / \text{VCL} \times 100$ will also be evaluated . In addition, according to low-cut VAP (LVV) and medium-cut VAP (MVV), the total sperm population will be divided into four categories: fast, with $\text{VAP} > \text{MVV}$; medium, with $\text{LVV} < \text{VAP} < \text{MVV}$; slow, with $\text{VAP} < \text{LVV}$ and static, which is the proportion of cells without movement. A calculation derived from CASA was performed according to Núñez-Martínez et al. (2006) (Table 1).

Chart 2. Sperm speed and movement indices.

Sperm speed index	$(\text{VCL} \times 0,87) + (\text{VSL} \times 0,76) + (\text{VAP} \times 0,90) + (\text{ALH} \times 0,92)$
Sperm movement index	$(\text{VSL} \times 0,59) + (\text{VAP} \times 0,37) + (\text{LIN} \times 0,95) + (\text{STR} \times 0,89) + (\text{WOB} \times 0,83)$

Fonte: (NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al. 2006).

For sperm morphology, a smear was made and stained using the modified Karras method (PAPA et al. 1988). 200 cells were counted and the

morphological changes were classified into normal cells, or with major or minor defects (BLOM, 1972).

The integrity of the membrane and acrosome, mitochondrial activity, generation of superoxide anion and hydrogen peroxide and lipid peroxidation were evaluated by flow cytometry, using the BD LSR Fortessa equipment (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipped with excitation lasers: blue 488-nm, 100 mW and emission filters 530 / 30nm (FITC, YOPRO, CM-H2DCFDA and C11-BODYPY) and 695 / 40nm (Iodide of propidium and MitoSOX Red); 640-nm red, 40 mW with 660/20 nm filter (MitoStatus Red); and the 405-nm violet, 100 mW, with the 450/50 nm filter (Hoechst). At least 10,000 cells per sample were analyzed and the data was evaluated using the BD FACSDiva™ v 6.1 software. For that, samples were diluted in TALP-PVA, according to Parrish et al. (1988) modified: 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM DL-lactate 60%, 2.0 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10.0 mM Hepes-free acid, 1.0 mM sodium pyruvate, 1.0 mg / mL polyvinyl alcohol-PVA and 25 µg / mL gentamicin) at a concentration of 5 x 10⁶ sperm / mL.

Hoechst 33342, propidium iodide (IP) and FITC-PSA (Pisum sativum agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate) were used to assess the integrity of the plasma and acrosomal membrane (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2012). Thus, in a sample of 200 µL of diluted semen, 7 µM of Hoechst 33342, 1.5 µM of IP and 2 ng of FITC-PSA were added. The samples were incubated for 15 min at 37 °C, protected from light.

To evaluate the plasma membrane destabilization, mitochondrial membrane potential and superoxide (O₂⁻) production in the mitochondrial

matrix, the association of Hoechst 33342, YOPRO (YP; cell marking with destabilized plasma membrane), MitoStatus Red (MST; mitochondrial potential) and MitoSOX TM Red (MSR; generation of superoxide anion in the mitochondrial matrix) was used (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2018). Thus, in a sample of 500 µL of diluted semen, 7 µM Hoechst 33342, 25 nM YP, 20 µM MST and 2 µM MSR were added, followed by incubation at 37 °C for 20 minutes.

For the assessment of intracellular hydrogen peroxide (H₂O₂) production, CM-H₂DCFDA (C6827, Life Technologies) was used, associated with Hoechst 33342 and propidium iodide. Thus, in 500 µL of the diluted semen solution, 7 µM Hoechst 33342, 1.5 µM propidium iodide and 1 µM CM-H₂DCFDA were added. The incubation was carried out for 20 min at 37 °C.

For lipid peroxidation, it was used the C11-BODYPY probe (D-3861; Molecular Probes) (GUASTI, et al. 2012). Thus, in 500 µL of semen diluted in TALP-PVA, 5 µM of C11-BODIPY581 / 591 were added, followed by incubation for 30 minutes at 37 °C. After incubation, 2 consecutive washes were performed by centrifugation at 300g for 5 minutes, with TALP-PVA and the pellet resuspended in 300 µl of TALP-PVA.

For the sperm binding test in the egg yolk perivitellin membrane, fresh and non-embryonic eggs were used (CSERMAK Jr, 2011). The perivitelline membrane was separated, washed with sterile DPBS pH 7.0, to remove all the yolk and mounted on two coupled circular silicone molds (3/16 "and 5/16"). The set was deposited in a 9-well glass plate containing TCM-199 medium (TCM-199; Gibco, Grand Island, NY) and stabilized in an oven with an atmosphere of 5% CO₂, at a temperature of 38.5° C. Each well was added with 0.5 x 10⁶

sperm / mL (3 wells / sample). The plates were incubated for 30 minutes in the same conditions and stained with 200 μ L of 143 mg / mL Hoechst 33342 (40 μ g / mL; H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) diluted in sterile DPBS pH 7, 0, maintained for 20 minutes. Then, the entire complex was washed to remove unbound sperm and analyzed under an epifluorescence microscope (Leica Biosystems® 147 DMI 3000b, Wetzlar, Germany) with 365 nm excitation filter and 410 nm barrier filter, in a 20 X magnification. 8 images of random fields in the complexes were made and the cells linked to the membrane were counted using the Image 150 Processing and Analyzes in Java, ImageJ (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012).

2.6 Sample preparation and mass spectrometry

After sperm analysis, the spermatozoa were separated by centrifugation at 800g for 10 minutes and separated at a concentration of 100×10^6 / mL. Seminal plasma and epididymal fluid (supernatant) were collected and recentrifuged at 10,000g, for 30 minutes, at 4° C. The spermatozoa were washed with simple Ringer with 3 centrifugations at 800g, for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was eluted with modified RIPA buffer (PEACH, et al., 2012) containing protease inhibitors (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM TRIS-HCl pH 7.5, 0.8 mmol EDTA, 1.0 μ g / mL aprotinin, 1.0 μ g / mL leupeptin and 35.0 μ g / mL PMSF in 50 mmol TRIS-HCl pH 7.2).

Sperm samples were sonicated (Sonifier Sound Encloresure Ultrasonics, Shanghai, China) according to Baker et al. (2002), modified by Souza et al. (2007), with a 3.0 mm probe, 20% amplitude, for 30 seconds in an ice bath, with

repetition of 10 times, with an interval of 1 minute between sets. After sonication, the samples were homogenized for 3 minutes and centrifuged at 10,000g at 4° C for 30 minutes and the supernatant was stored at -20° C.

Samples were concentrated by acetone (BOLLAG et al., 1996), and then the concentration of total proteins was determined by the A280 method (Nanodrop-One, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The proteins were subjected to 1D SDS-PAGE electrophoresis until the samples reached the separation gel, which was then stained with Comassie Blue (BOLLAG et al., 1996). The bands were detached and the protein digestion was carried out according to Shevchenko et al. (1996), with modifications. Briefly, the gel fragments were bleached with 50% methanol and 2.5% acetic acid, dehydrated with 100% acetonitrile. The reduction of disulfide bridges with DTT (Bio-Rad®, Lagoa Santa, Brazil) and alkylation with iodoacetamide (Bio-Rad® Santo Amaro, Brazil). Peptide digestion was performed overnight with trypsin (20 ng / μ L) 1: 50 trypsin / substrate. The peptides were extracted with 5% formic acid. Then, the samples were concentrated (SPD1010 Integrated SpeedVac™ Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

For mass spectrometry, samples were diluted in 0.1% formic acid, in a concentration of 0.7 μ g protein / μ L, homogenized and centrifuged at 1,100 g for 5 minutes. Then, 20 μ L of the supernatant was deposited in glass tubes for mass spectrometer (Clear glass 12 x 32 mm screw neck total recovery vial with cap, Waters Corporation, Milford, MA, USA). The tubes were coupled to the equipment and a 4.5 μ L aliquot was used for separation on a C18 column (100 μ m x 100 mm, RP-nano UPLC column, Waters® nanoACQUITY UPLC®, Waters Corporation, Milford, MA, USA) coupled to a Q-ToF mass spectrometer

(Micromass® Q-ToF PREMIER® Mass Spectrometer, Waters Corporation, Milford, MA, USA) with nanoelectrospray source at a flow of 0.600 μ L / minute. A gradient of acetonitrile (2-90%) in 0.1% formic acid was maintained for 60 minutes. The nanoelectrospray voltage was maintained at 3.5 kV, a 30 V voltage cone and at a temperature of 100 μ C. The instrument was operated in top three, in which a mass spectrum (MS) was acquired, followed by MS / MS of the 3 most intense peaks. After the MS / MS fragmentation, the ion was kept in the exclusion list for 60s and for the analysis of the cleavage of endogenous peptides a current exclusion time was used.

The search parameters included trypsin as a protease, with a maximum of 1 cleavage allowed; carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and oxidation of methionine as variable modification and the tolerance of 0.1 Da for precursor ions (MS) and fragments (MS / MS), and monoisotopic molecular mass.

The specters were acquired using MassLynx [™] v.4.1 software (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and the raw data were converted to the peak list format (.mgf, mascot generic format), without adding scans, and searched in the UniprotSProt 10116 database (<http://www.uniprot.org/>) taxonomy *Canis lupus familiaris*, using the Mascot version 2.3.02 and Mascot Distiller MDRO version 2.4.0.0 tool (Matrix Science Inc, Boston, MA, USA) . The results were submitted to the Protein Pilot Software 4.0 program (AB Sciex, Framingham, USA) to analyze the data and validate the MS / MS peptides and identify the proteins. After identification, data were entered into UniprotKB (www.uniprot.org.br) and Phanter (www.pantherdb.org, MI et al., 2017) to obtain the gene ontology using the categories molecular function, biological process and cell component.

The relative amount of each protein in the mixture was determined by the exponentially modified protein abundance index (emPAI), obtained by the Mascot Distiller software.

2.7. Statistics

The data obtained in the studied groups (PS versus FE and EJAC versus EPID) were compared, including sperm quality, by the Mann-Whitney non-parametric test using the Sigma Plot 11.0 program (SYSTAT Software, San Jose, CA, USA), since even after the data had been transformed, they remained nonparametric. The results were presented as median, minimum, maximum and P value.

For the analysis of the results of the proteomics, the data were normalized. For normalization, groups in which sample contained more than 50% expression of a protein were maintained; otherwise, they were reset to zero when only in one group or excluded when it occurred in both groups. Then, the emPAI of each protein was divided by the sum of the emPAIs of that protein of all animals. These data were submitted to non-hierarchical cluster analysis (multivariate analysis) using the free software Metaboanalyst 3.0 (XIA; WISHART, 2016). The principal component analysis (PCA) was used to describe the formation of the groups in a score matrix and partial least squares analysis (PLS-DA) which indicated the relevance of each protein in the division of the groups. The PLS-DA was used to calculate the projection score of the variables (VIP score). The most relevant proteins were considered when VIP score was $\alpha \geq 1$ (CHECA et al., 2015). These groups were compared to each other using the Student's t-test using the Sigma Plot 11.0 program (SYSTAT

Software, San Jose, CA, USA).

3. Results

3.1. Analysis of sperm quality

The sperm kinetics data from the EJAC and EPID groups, obtained by the Computer-Aided Semen Analyzer (CASA), showed statistical difference ($p < 0.01$) only in the parameters of progressive motility (MOT PROG), straightness (STR), linearity (LIN) and oscillation coefficient (WOB), which were higher in the EJAC group (Table 1).

Table 1. Data on the sperm kinetics of cells in the EJAC and EPID groups, obtained by the Computer-Aided Semen Analyzer (CASA), expressed as median, minimum, maximum and P.

CASA (Kinetic Analysis)	EJAC			EPID			P=
	MEDIAN	MIN.	MAX.	MEDIAN	MIN.	MAX.	
Total motility - %	94,000	82,000	97,000	93,000	94,000	90,000	0,548
Progressive motility - % ♦	73,000	71,000	77,000	67,000	62,000	71,000	0,008
Average path velocity - $\mu\text{m/s}$	143,600	114,400	155,100	136,200	108,300	142,600	0,222
Straight line velocity - $\mu\text{m/s}$	126,000	98,500	140,900	105,700	85,100	116,500	0,056
Curvilinear velocity - $\mu\text{m/s}$	187,800	161,000	229,300	211,100	189,400	230,000	0,151
Amplitude of lateral head displacement - μm	6,100	5,700	8,400	7,700	7,300	8,800	0,095
Beat cross frequency - Hz	25,000	21,500	32,200	25,100	20,000	28,200	0,548
Straightness - % ♦	85,000	78,000	91,000	78,000	76,000	83,000	0,032
Linearity - % ♦	67,000	52,000	69,000	48,000	61,000	46,000	0,032
Elongation - %	58,000	55,000	60,000	56,000	52,000	62,000	0,841
Wobble - $\mu\text{m/s}$ ♦	7,350	6,400	11,700	6,050	5,710	6,760	0,016
Mean head area - μm^2	8,200	6,400	9,300	7,100	6,800	9,900	0,548
Percentage of rapid spermatozoa - %	89,000	78,000	95,000	90,000	87,000	92,000	1,000

Percentage of medium spermatozoa - %	2,000	1,000	5,000	3,000	2,000	4,000	0,841
Percentage of slow spermatozoa - %	6,000	3,000	14,000	6,000	6,000	9,000	0,690
Percentage of static spermatozoa - %	0,000	0,000	4,000	1,000	0,000	0,200	0,548
Sperm velocity index	428,667	323,502	473,207	397,026	334,192	423,304	0,421
Sperm movement index	275,992	241,836	294,293	254,313	221,097	276,738	0,421

♦ Statistical difference between groups using Mann-Whitney test.

The morphological analysis of the spermatozoa of the EJAC and EPID groups showed a high index of normal sperm, with no statistical difference between the groups (Table 2).

Table 2. Spermatozoa morphology indices expressed as median, minimum, maximum and P value.

Spermatozoa	EJAC			EPID			P =
	MEDIAN	MIN.	MAX.	MEDIAN	MIN.	MAX.	
Normal	187,0	177,0	198,0	190	186,0	191,0	0,841
With major defects	7,0	0,0	11,0	7,0	0,0	11,0	0,841
With minor defects	6,0	2,0	12,0	3,0	2,0	13,0	0,421

There was no statistical difference between groups using the Mann-Whitney test.

The variables evaluated by flow cytometry demonstrated that the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and the percentage of damaged and intact acrosomal plasma membrane in the cells of the EJAC group, was higher than that of the EPID group. The lipid peroxidation index in AU (arbitrary units) was statistically higher in cells of the EJAC group. (TABLE 3).

Table 3. Morphofunctional sperm variables obtained in flow cytometry expressed as median, minimum, maximum and P value.

Morphofunctional sperm variables		EJAC			EPID			P=
in flow cytometry		MEDIAN	MIN.	MAX.	MEDIAN	MIN.	MAX.	
	Cells without							
Membrane destabilization	membrane destabilization (%)	87,9	74,9	92,9	87,4	83,4	93,0	0,690
	High potential (%)	77,6	0,0	89,0	87,0	0,0	93,1	0,841
	Total cells (AU)	4342,0	0,0	8429,0	22236,0	0,0	27189,0	0,548
Mitochondrial potential	Healthy cells (AU)	5551,0	0,0	8975,0	22935,0	0,0	27760,0	0,548
	Injured cells (AU)	1619,0	0,0	2040,0	255,0	0,0	567,0	0,310
	High potential (AU)	6462,0	0,0	28236,0	22998,0	0,0	27943,0	1,000
	H ₂ O ₂ (%)	87,8	84,5	92,0	71,8	42,5	95,3	0,310
	Total cells (AU)	406,0	134,0	553,0	122,0	83,0	248,0	0,032
Hydrogen peroxide production (H ₂ O ₂)	♦							
	Healthy cells (AU) ♦	413,0	136,0	600,0	129,0	88,0	255,0	0,032
	Injured Cells (AU) ♦	157,0	69,0	195,0	62,0	44,0	121,0	0,032
	H ₂ O ₂ (AU)	414,0	139,0	607,0	148,0	125,0	256,0	0,095
	Injured plasmatic							
Plasmatic and acrosomal membrane integrity	membrane and healthy acrossomal membrane (%)	4,3	3,2	5,8	7,2	1,6	10,1	0,310
	Injured plasmatic and	3,3	1,1	4,7	2,6	0,7	3,4	0,548

	acrossomal							
	membranes (%)							
	Healthy							
	plasmatic and	88,8	79,1	91,3	88,9	86,1	94,8	0,421
	acrossomal							
	membranes (%)							
	Healthy							
	plasmatic							
	membrane and							
	injured	4,4	1,9	11,2	1,4	1,3	2,9	0,016
	acrossomal							
	membrane (%)							
	♦							
	High							
	concentration of							
	superoxide cells	43,3	7,4	84,1	15,4	0,2	87,2	1,000
	(%)							
Anion	Total cells (AU)	292,0	146,0	2483,0	353,0	25,0	2064,0	0,841
superoxide	Healthy cells							
production (O ₂ ⁻	(AU)	234,0	139,0	2656,0	310,0	21,0	2101,0	0,548
)	Injured cells							
	(AU)	1580,0	965,0	1922,0	1207,0	46,0	2746,0	0,548
	High							
	concentration of							
	superoxide cells	1653,0	1011,0	2795,0	2061,0	1369,0	2503,0	0,841
	(AU)							
	Lipidic							
	peroxidation	7,8	3,7	18,7	6,4	2,8	10,9	0,310
Lipidic	cells (%)							
peroxidation	Lipidic							
	peroxidation	2010,0	1745,0	2395,0	939,0	484,0	1757,0	0,016
	cells (AU) ♦							

AU - arbitrary unit

♦ Statistical difference between groups using the Mann-Whitney test.

The number of cells attached to the egg perivitellin membrane was statistically similar ($P = 0.571$) in the EJAC and EPID groups (Table 4).

Table 4. Number of cells attached to the egg perivitellin membrane during the binding test, expressed as median, minimum, maximum and P value.

Goup	MEDIAN	MIN.	MAX.	P =
EJAC	1242,5	172,0	5800,0	0,571
EPID	914,0	568,0	1601,0	

There was no statistical difference between the groups using the Mann-Whitney test.

3.2. Proteomics of ejaculate spermatozoa and seminal plasma

In the spermatozoa from the ejaculate and seminal plasma samples, 177 proteins were found, 122 of which were found only in sperm and 31 only in seminal plasma. Of these, 30 had differentiated expression or were not expressed in one of the groups, 16 were up-regulated in ejaculated sperm (Table 5) and 14 in seminal plasma (Table 6).

Table 5. Up-regulated proteins in ejaculated spermatozoa when compared to seminal plasma by fold change and test-t analysis.

Protein	ID Uniprot ⁺	Fold change ⁺	log2(FC)	t.stat	P value	FDR
Acrosin	F6V5L4	103.420	6.692	5.642	< 0.001	< 0.001
Acrosin binding protein	E2RNS8	112.790	6.817	5.610	< 0.001	< 0.001
Acrosomal vesicle protein 1	F1PS44	107.710	6.751	3.796	0.001	0.003
Arylsulfatase A precursor	F6PKZ1	92.378	6.530	3.841	0.001	0.003
Beta-N-acetylhexosaminidase subunit, exons 2-14 (Fragment)	beta K0J5K2	0.014	-6.197	-3.766	0.001	0.003
Enolase 1	F1PCH3	135.110	7.078	3.491	0.002	0.004
Glyceraldehyde-3-phosphate	E2RC89	105.080	6.715	3.646	0.002	0.003

dehydrogenase						
Hyaluronidase	E2RCK6	96.326	6.590	4.473	< 0.001	0.001
Interleukin 4 induced	F1PF34	103.570	6.695	5.628	< 0.001	< 0.001
IZUMO family member 4	E2QXV4	105.070	6.715	5.624	< 0.001	< 0.001
Sperm acrosome membrane-associated protein 3	B6VH75	100.710	6.654	3.824	0.001	0.003
Uncharacterized protein	J9NZ99	89.045	6.477	3.595	0.002	0.003
Uncharacterized protein	J9P314	234.230	7.872	3.444	0.003	0.004
Uncharacterized protein	F1PN3	100.730	6.654	3.652	0.002	0.003
Uncharacterized protein	F1PZ03	127.920	6.999	4.396	0.000	0.001
Zona pellucida binding protein	F1P704	92.645	6.534	3.835	0.001	0.003

¹<https://www.uniprot.org/>; ²Threshold = 2

Table 6. Up-regulated proteins in seminal plasma when compared to those of ejaculated spermatozoa by fold change and t-test analysis.

Protein	ID Uniprot ¹	Fold change ²	log2(FC)	t.stat	p.value	FDR
Alkaline phosphatase	F1PF95	0.014	-6.158	-4.642	< 0.001	0.001
Carboxylic ester hydrolase	F1PQX8	0.013	-6.234	-2.948	0.008	0.011
Clusterin	E2QYU2	0.015	-6.020	-6.435	< 0.001	< 0.001
Keratin, type II cytoskeletal 1	F1PTY1	0.008	-6.940	-3.716	0.001	0.003
NPC intracellular cholesterol transporter 2	F1PAR9	0.011	-6.566	-18.035	< 0.001	< 0.001
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	F1PLV2	0.019	-5.751	-2.434	0.025	0.030
Prostaglandin-H2 D-isomerase	Q9XS65	0.014	-6.201	-4.638	0.000	0.001
Ribonuclease A K1	E2RG75	0.016	-6.001	-2.394	0.027	0.031
Serum albumin	F2Z4Q6	0.012	-6.374	-8.554	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	E2R6E0	0.010	-6.662	-15.742	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	E2RCT1	0.016	-5.947	-3.023	0.007	0.010
Uncharacterized protein	F1PSX2	0.014	-6.203	-3.801	0.001	0.003
Uncharacterized protein	F1PQL8	0.012	-6.334	-15.398	< 0.001	< 0.001
WAP four-disulfide core domain protein 2	F1PDT8	0.017	-5.879	-2.443	0.024	0.030

¹<https://www.uniprot.org/>; ²Threshold = 2

The multivariate analysis identified the separation of groups in the PCA and the dendrogram (Figure 1), with the sum of PC1 and PC2 being significant

(> 50%) of 70.2%.

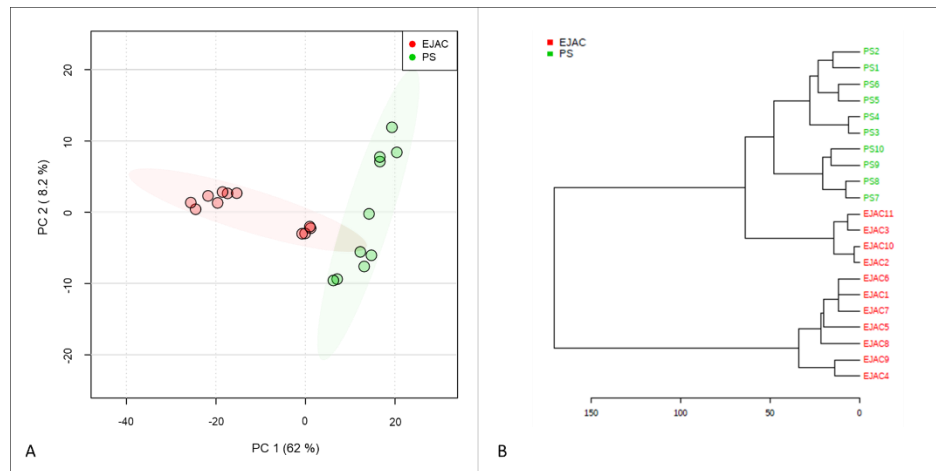


Figure 1. Multivariate analysis of proteins from ejaculated spermatozoa (EJAC) and seminal plasma (PS) identifying the distribution between clusters. A. Principal component analysis (PCA). B. Dendrogram. Note the sum of PC1 + PC2 = 70.2%.

In the VIP score analysis, 15 proteins with $\alpha \geq 1$ were found, of which 7 were up-regulated in ejaculated sperm and 8 in seminal plasma (Figure 2). They are Acrosin binding protein (E2RNS8), Acrosin (F6V5L4), IZUMO family member 4 (E2QXV4), Interleukin 4 induced (F1PF34), Uncharacterized protein (J9P314), Uncharacterized protein (F1PZ03) and Hyaluronidase (E2RCK6) and plasma without NPC intracellular cholesterol transporter 2 (F1PAR9), Uncharacterized protein (E2R6E0), Uncharacterized protein (F1PQL8), Albumin serum (F2Z4Q6), Clusterin (E2QYU2), Keratin, type II cytoskeletal 1 (F1PTY1), Alkaline phosphatase (F1PF95) e Prostaglandin-H2 D-isomerase (Q9XS65).

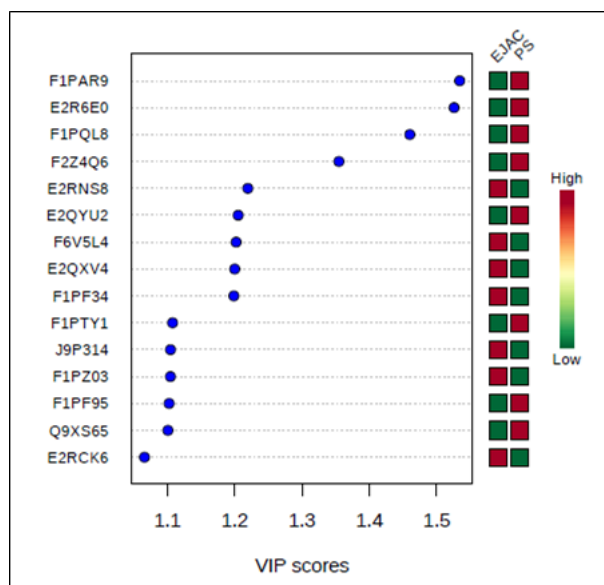


Figure 2. Variable importance in projection (VIP) score of ejaculated spermatozoa protein (EJAC) and seminal plasma (PS) ($Q2 > 0.85$ in PC3).

3.3. Proteomics of epididymal spermatozoa and epididymal fluid

In the epididymal spermatozoa and epididymal fluid samples, 241 proteins were found, 113 of which were found only in the spermatozoa and 66 only in the epididymal fluid. Of the total proteins found in these samples, 41 had differentiated expression or were not expressed in one of the groups, 27 were up-regulated in the epididymal sperm (Table 7) and 14 epididymal fluid (Table 8).

Table 7. Up-regulated proteins in epididymal spermatozoa when compared to epididymal fluid by fold change and test-t analysis.

Protein	ID Uniprot ¹	Fold change ²	log2(FC)	t.stat	P value	FDR
Acrosin	F6V5L4	21.272	4.411	5.824	< 0.001	< 0.001
Acrosin binding protein	E2RNS8	25.458	4.670	4.836	< 0.001	< 0.001
Acrosomal vesicle protein 1	F1PS44	22.396	4.485	12.91	< 0.001	< 0.001

Arylsulfatase A precursor	F6PKZ1	19.581	4.291	5.870	< 0.001	< 0.001
ATP synthase subunit alpha	A0A1B1X469	25.327	4.663	17.460	< 0.001	< 0.001
Chromosome 17 C1orf56 homolog	F1PCG1	19.844	4.311	6.359	< 0.001	< 0.001
Cytochrome c oxidase subunit 2	A0A060G WV3	22.347	4.482	10.056	< 0.001	< 0.001
Fructose-bisphosphate aldolase	F1PBT3	24.595	4.620	8.625	< 0.001	< 0.001
Glucose-6-phosphate isomerase	E2R2C3	18.277	4.192	6.586	< 0.001	< 0.001
Hyaluronidase	E2RCK6	13.822	3.789	7.423	< 0.001	< 0.001
Interleukin 4 induced	F1PF34	20.249	4.340	6.471	< 0.001	< 0.001
IZUMO family member 4	E2QXV4	23.492	4.554	11.235	< 0.001	< 0.001
Izumo sperm-egg fusion 1	F6UM65	42.043	5.394	6.185	< 0.001	< 0.001
L-lactate dehydrogenase	E2RLK0	20.091	4.329	7.985	< 0.001	< 0.001
Parkinsonism associated deglycase	E2QS13	19.873	4.313	6.109	< 0.001	< 0.001
Phosphoglycerate mutase	H9GW55	21.865	4.451	13.323	< 0.001	< 0.001
Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha	E2QZV5	25.360	4.665	5.044	< 0.001	< 0.001
Saccharopine dehydrogenase (putative)	F1Q2B1	7.741	2.953	5.608	< 0.001	< 0.001
Sperm acrosome membrane-associated protein 3	B6VH75	22.483	4.491	12.742	< 0.001	< 0.001
Superoxide dismutase	E2RSF2	24.638	4.623	5.363	< 0.001	< 0.001
Tubulin alpha chain	F1PE21	19.064	4.253	6.408	< 0.001	< 0.001
Tubulin beta chain	L7N0I7	25.472	4.671	16.555	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	F1PCE8	19.891	4.314	6.451	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	F1PNI3	22.128	4.468	9.416	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	J9NZ99	6.592	2.721	4.844	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	F1PM13	18.627	4.219	8.573	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein3	F1PZ03	18.725	4.227	8.042	< 0.001	< 0.001

¹<https://www.uniprot.org/>; ²Threshold = 2

Table 8. Up-regulated proteins in the epididymal fluid when compared to those of the epididymis spermatozoa by the fold change and test-t analysis.

Protein	ID Uniprot ¹	Fold change ²	log2(FC)	t.stat	P value	FDR
---------	-------------------------	--------------------------	----------	--------	---------	-----

Beta-N-acetylhexosaminidase subunit, exons 2-14 (Fragment)	beta K0J5K2	0.191	-2.388	-6.376	< 0.001	< 0.001
Carboxylic ester hydrolase	F1PQX8	0.192	-2.384	-6.294	< 0.001	< 0.001
Epididymal sperm-binding protein 1	E2RCP0	0.188	-2.410	-6.054	< 0.001	< 0.001
Globin A2	A0A1K0GG H0	0.191	-2.389	-5.843	< 0.001	< 0.001
Glutathione peroxidase	F1PJ71	0.189	-2.400	-6.695	< 0.001	< 0.001
NPC intracellular cholesterol transporter 2	F1PAR9	0.191	-2.389	-6.716	< 0.001	< 0.001
Ribonuclease A K1	E2RG75	0.188	-2.413	-5.720	< 0.001	< 0.001
Serum albumin	F2Z4Q6	0.189	-2.403	-6.075	< 0.001	< 0.001
Sulfhydryl oxidase	F1PLT8	0.188	-2.414	-6.431	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	E2R6E0	0.189	-2.401	-6.291	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	E2RCT1	0.185	-2.431	-6.086	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	J9JHF7	0.191	-2.387	-5.900	< 0.001	< 0.001
Uncharacterized protein	F1PQL8	0.191	-2.385	-5.994	< 0.001	< 0.001
Zona pellucida binding protein	F1P704	31.741	4.988	7.146	< 0.001	< 0.001

¹<https://www.uniprot.org/>; ²Threshold = 2

Multivariate analysis identified the separation of groups in the PCA and the dendrogram (Figure 3), with the sum of PC1 and PC2 being significant (> 50%) of 75%.

In the VIP score analysis, 15 proteins with $\alpha \geq 1$ were found, all of which were up-regulated in the epididymis spermatozoa (Figure 4). They are: IZUMO family member 4 (E2QXV4), Arylsulfatase A precursor (F6PKZ1), Uncharacterized protein (F1PCE8), Zona pellucida binding protein (F1P704), Acrosomal vesicle protein 1 (F1PS44), Sperm acrosome membrane-associated protein 3 (B6VH75), Interleukin 4 induced (F1PF34), Fructose-bisphosphate aldolase (F1PBT3), Glucose-6-phosphate isomerase (E2R2C3), Hyaluronidase (E2RCK6), Acrosin (F6V5L4), Chromosome 17 C1orf56 homolog (F1PCG1), Tubulin beta chain (L7N0I7) and Uncharacterized protein (F1PZ03).

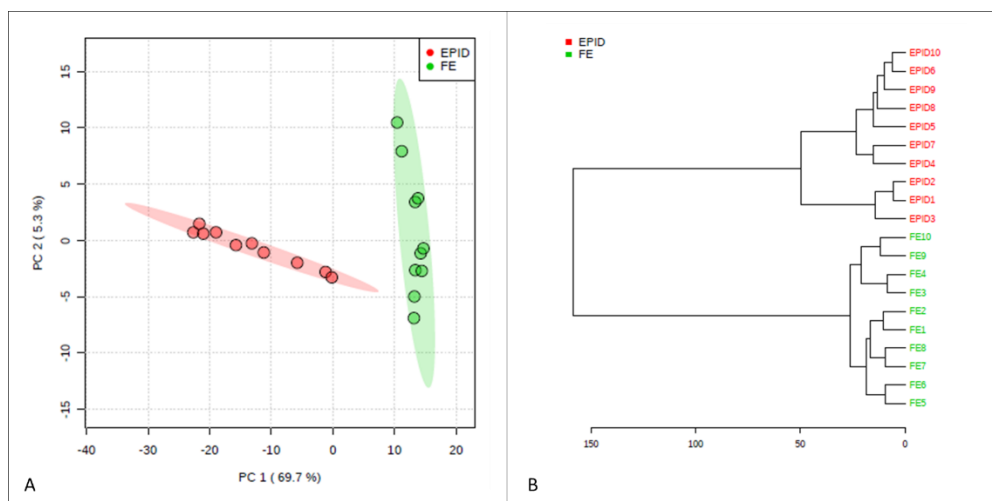


Figure 3. Multivariate analysis of ejaculate spermatozoa (EJAC) and seminal plasma (PS) proteins identifying the distribution between clusters. A. Principal component analysis (PCA). B. Dendrogram. Note the sum of PC1 + PC2 = 75%.

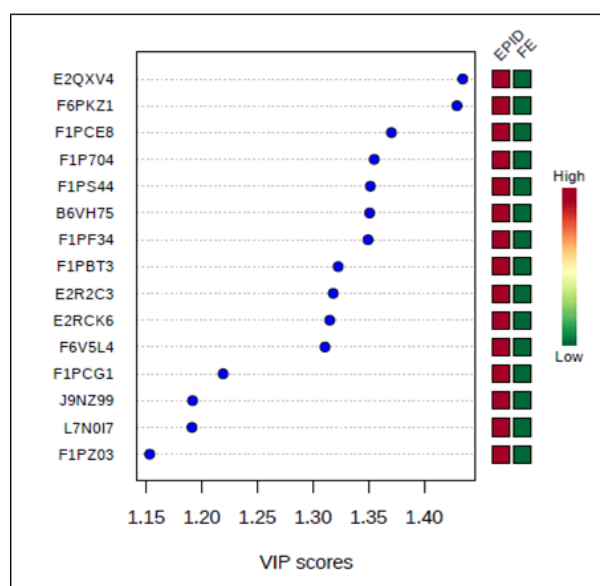


Figure 4. Variable importance in projection (VIP) score of epididymal spermatozoa proteins (EPID) and epididymal fluid (EF) ($Q^2 > 0.95$ in PC3).

3.4. Proteomics of ejaculated and epididymal spermatozoa

In the ejaculated and epididymal spermatozoa samples, 210 proteins were found, 35 of which were found only in ejaculated spermatozoa and 63 in epididymal spermatozoa. Of the total proteins found in these samples, 20 had different expression or were not expressed in one of the groups, 3 were up-regulated in the ejaculated spermatozoa (Table 9) and 17 in the epididymis spermatozoa (Table 10).

Table 9. Up-regulated proteins in ejaculated spermatozoa when compared to epididymal spermatozoa by test-t and fold change analysis.

Protein	ID Uniprot ¹	Fold change ²	log2(FC)	t.stat	P value	FDR
CE10 protein	Q9XSV4	25.149	4.653	7.495	< 0.001	< 0.001
Kallikrein A1	A0A1R3UGQ4	26.437	4.725	4.687	< 0.001	0.001
Uncharacterized protein F1PR54	F1PR54	25.805	4.690	3.658	0.002	0.006

¹<https://www.uniprot.org/>; ²Threshold = 2

Table 10. Up-regulated proteins in epididymal spermatozoa when compared to ejaculated sperm by fold change and test-t analysis.

Protein	ID Uniprot ¹	Fold change ²	log2(FC)	t.stat	P value	FDR
ATP synthase subunit alpha	A0A1B1X469	0.054	-4.214	-2.568	0.019	0.028
Chromosome 17 C1orf56 homolog	F1PCG1	0.075	-3.728	-4.462	< 0.001	0.001
Cytochrome c oxidase subunit 2	A0A060GWV3	0.072	-3.788	-3.074	0.006	0.012
Fructose-bisphosphate aldolase	F1PBT3	0.064	-3.967	-7.375	< 0.001	< 0.001
Glucose-6-phosphate isomerase	E2R2C3	0.064	-3.965	-6.190	< 0.001	< 0.001
Hyaluronidase	E2RCK6	0.055	-4.182	-5.394	< 0.001	< 0.001

Izumo sperm-egg fusion 1	F6UM65	0.078	-3.678	-3.306	0.004	0.009
L-lactate dehydrogenase	E2RLK0	0.086	-3.533	-3.316	0.004	0.009
Parkinsonism associated deglycase	E2QS13	0.080	-3.649	-3.037	0.007	0.012
Phosphoglycerate mutase	H9GW55	0.065	-3.939	-5.909	< 0.001	< 0.001
Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha	E2QZV5	0.079	-3.665	-3.284	0.004	0.009
Saccharopine dehydrogenase (putative)	F1Q2B1	0.082	-3.600	-3.270	0.004	0.009
Superoxide dismutase	E2RSF2	0.077	-3.707	-3.332	0.004	0.009
Tubulin alpha chain	F1PE21	0.077	-3.708	-3.127	0.006	0.011
Tubulin beta chain	L7N0I7	0.082	-3.604	-4.447	< 0.001	0.001
Uncharacterized protein	F1PM13	0.057	-4.129	-2.720	0.014	0.021
Uncharacterized protein	F1PZ03	0.059	-4.073	-2.882	0.010	0.016

¹<https://www.uniprot.org/>; ²Threshold = 2

Multivariate analysis identified the separation of groups in the PCA and the dendrogram (Figure 5), with the sum of PC1 and PC2 being significant (> 50%) of 62,3%.

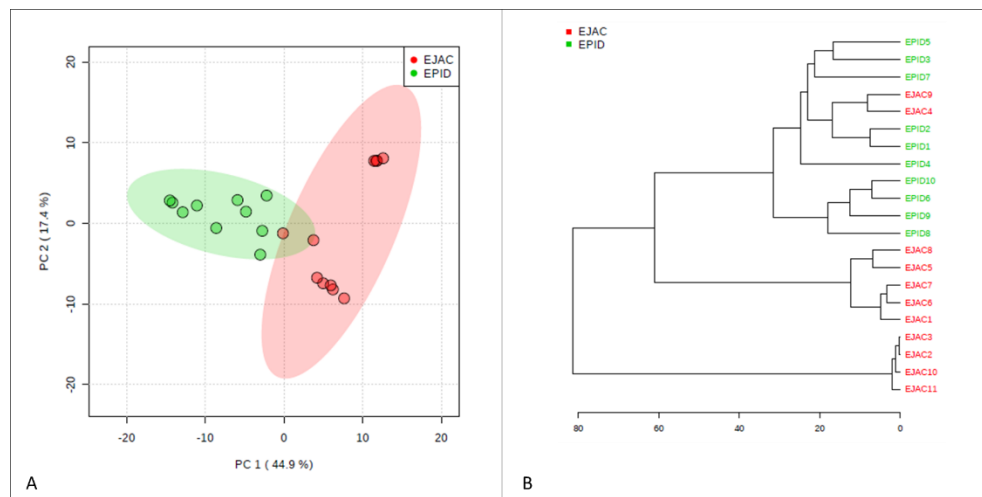


Figure 5. Multivariate analysis of ejaculate spermatozoa (EJAC) and epididymis spermatozoa (EPID) proteins identifying the distribution between clusters. A. Principal component analysis (PCA). B. Dendrogram. Note the sum of PC1 + PC2 = 62.3%.

In the VIP score analysis, 9 proteins with $\alpha \geq 1$ were found, 3 of which were up-regulated in the ejaculate spermatozoa and 6 in the epididymis spermatozoa (Figure 6). The up-regulated proteins in the ejaculate spermatozoa were CE10 protein (Q9XSV4), Kallikrein A1 (A0A1R3UGQ4), Uncharacterized protein (F1PR54) and in the spermatozoa of the epididymis were Fructose-bisphosphate aldolase (F1PBT3), Glucose-6-phosphate-6-phosphate, Hyaluronidase (E2RCK6), Phosphoglycerate mutase (H9GW55), Chromosome 17 C1orf56 homolog (F1PCG1), Tubulin beta chain (L7N0I7), Uncharacterized protein (F1PZ03), Superoxide dismutase (E2RSF2), Cytochrome 2 ox3e cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha (E2QZV5), Izumo sperm-egg fusion 1 (F6UM65) and Tubulin alpha chain (F1PE21).

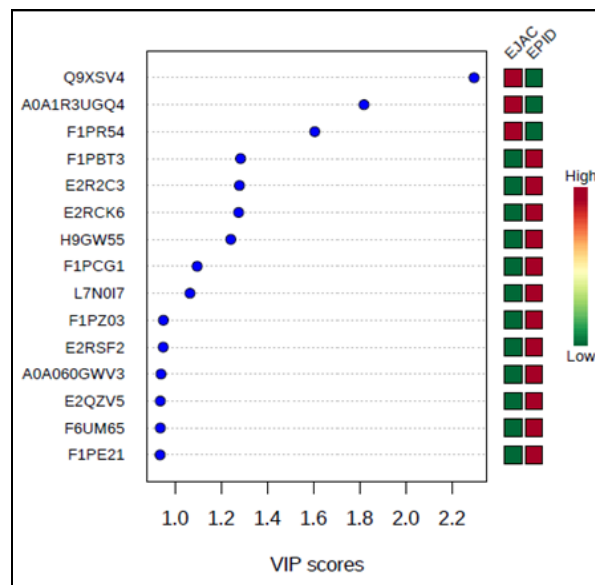


Figure 6. Variable importance in projection (VIP) score of the ejaculate spermatozoa (EJAC) and epididymis spermatozoa (EPID) proteins ($Q^2 > 0.75$ in PC4).

4. Discussion

The data obtained by the analysis of sperm kinetics revealed that the spermatozoa in the EJAC group had higher percentages of progressive motility, straightness, linearity and oscillation coefficient than that from the EPID group. This difference can be explained by the presence of decapacitating factors present in the epididymis that keep sperm in a state of quiescence until the moment of ejaculation, where contact with the seminal plasma and its components activate it (KOROCHINA et al. 2014).

The high index of normal spermatozoa in both groups did not produce a statistical difference. The cells from the EPID group were collected from the tail of the epididymis where, having already gone through the maturation process, were stored until the moment of ejaculation (VARESI et al., 2013). Thus, having already occurred sperm maturation and the epididymal sperm cells coming from the same healthy individuals from which the ejaculate was collected, it was expected that the morphological characteristics observed in both groups were similar.

In the evaluation of the variables by flow cytometry it was demonstrated that both groups had high quality and integrity sperm cells. This corroborates the fact that there was no statistical difference between the groups regarding the egg perivitellin membrane-binding test, although, mathematically, a larger number of cells in the EJAC group have bound to the membrane.

After proteomic analysis of the sperm cells of the ejaculate, the epididymis, the epididymal fluid and seminal plasma, 284 distinct proteins were detected. To find out the more relevant ones, it was used the method of statistical analysis of partial least squares (PLS-DA) and then the calculation of

the projection score of the variables (VIP score, $\alpha \geq 1$) was performed. The groups were also compared to each other using the Student's t-test, giving credibility to the information obtained.

Despite the importance of the topic, few studies have used proteomics to catalog the proteins present in canine sperm cells, seminal plasma and epididymal fluid. However, we found that only a few of the highlighted proteins in this study have been or are being tested as contraceptives.

The proteins found in higher abundance in EJAC group when compared to SP group were acrosin (F6V5L4), acrosin binding protein (E2RNS8), Interleukin interleukin 4 induced (F1PF34) and IZUMO family member 4 (E2QXV4).

The acrosin binding protein is a binding protein for both the precursor and intermediate forms of serine protease acrosin, which is the major protease of mammalian spermatozoa (BABA et al., 1994). It is a serine protease of trypsin-like cleavage specificity, synthesized in a zymogen form, proacrosin and stored in the acrosome (ADHAM et al, 1997; PRIMAKOFF, 1994). It is located at acrosomal vesicle and acts in acrosome reaction, activation of adenylate cyclase activity, binding of sperm to zona pellucida and penetration of zona pellucida (WASSARMAN et al, 2001; GUPTA, BHANDARI, 2011). Immunization with purified acrosin was tried without success in female sheep and rabbits (MORTON, MCANULTY, 1979; SYNER et al., 1979). A vaccine tested in monkeys, based on follicle stimulating hormone (FSH), resulted in infertility by generating spermatozoa lacking in acrosine and hyaluronidase (MOULDGAL et al., 1992), another protein whose function is similar to that of acrosine. Later, it was found that reduced, or even absent, acrosin activity spermatozoa are

capable to achieve fertilization, although they have a disadvantage to do it if compared to normal spermatozoa (ADHAM et al, 1997). Another research, proposed a gene immunization model where mice were injected with a cloned gene sequence encoding human proacrosin (h-proacrosin), causing impairment in the fertility of the treated animals (VEUTE et al., 2009). These data shows that acrosin proteins reduce but do not prevents fertilization. We believe that due this limitation, the utility of these proteins on a future contraceptive vaccine should be limited.

The interleukin 4 induced 1 is related to the cellular amino acid catabolic process, which generates reactive oxygen species (ROS). It also, acts in the cell capacitation, can down regulates the production of proinflammatory cytokines and regulate immune responses (OMU et al., 1998). Due its immunologic properties, this protein was proposed as adjuvant to contraceptive vaccines aiming for a better antigen delivery and enhancement of immune responses (RAMSAY, RAMSHAW, 1997; CLYDESDALE et al., 2004).

The family IZUMO proteins, like the IZUMO family member 4, are located at spermatozoa head (YOUNG et al., 2016) and has a role in the cell adhesion and fusion of mammal's sperm to egg plasma membrane (INOUE et al., 2005). In addition, it is involved in single fertilization (BIANCHI et al., 2014), heterotypic cell-cell adhesion and sperm-egg recognition (OHTO et al., 2016). This protein family is required for occurring fertilization as described in an study in mices knockout to this protein, despite being healthy, produced morphologically normal spermatozoa, which were unable to fuse with eggs (INOUE et al., 2005). Based on these findings, it was possible to create a contraceptive vaccine with these proteins for female rodents that induced a long, effective and reversible

contraceptive effect (NAZ, 2007). This is a promising protein to achieve a contraceptive vaccine (WANG et al., 2009; NAZ, 2014).

The up-regulated proteins in seminal plasma when compared to ejaculated spermatozoa was the NPC intracellular cholesterol transporter 2 (F1PAR9), serum albumin (F2Z4Q6), uncharacterized protein (E2R6E0) and uncharacterized protein (F1PQL8).

The NPC intracellular cholesterol transporter 2, also called as epididymal secretory protein E1 is a protein located at the epididymal extracellular area, and acts in the intracellular cholesterol transport, influencing the sperm maturation (MANJUNATH, 2002). This protein was detected in the seminal plasma of boars (GONZALEZ-CADAVID et al., 2014), bulls (MOURA et al., 2010; BOE-HANSEN, et al. 2015), rams (BERNARDINI, et al., 2011, LEDESMA et al., 2014) and men (GIACOMINI, et al., 2015). At this moment we could not find any paper linking this protein to contraceptive vaccine research.

The serum albumin (F2Z4Q6) is another protein located in the extracellular area and came from the testis, epididymis, prostate, and also from the blood (ELZANATY et al., 2007). It acts in the fatty acid binding and zinc ion binding, affecting the plasma membrane of the spermatozoa, allowing the capacitation (PETERS, 1975; AONUMA et al., 1978; VISCONTI et al., 1999; VISCONTI et al., 1999). Due to the presence in blood and its consequent non-specificity, it is unlikely that this protein could be used to formulate a contraceptive vaccine.

The lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein (E2R6E0) are from a protein family located at the extracellular area and are related to small molecule binding, such as fatty acids, having a role in the sperm

maturation (JUAREZ et al., 2020). Lipocalins proteins were identified in the seminal plasma of boars (GONZALEZ-CADAVID et al., 2014), rats (FOUCHECOURT et al., 2003), mice (SUZUKI et al., 2004), rainbow trout (NYNCA et al., 2011) and men (MILARDI et al., 2012). The varied biological functions of the lipocalins requires more studies that can bring a protein of this family with a specificity that allows using it as a candidate to a contraceptive vaccine.

The uncharacterized protein (Z4YHI2) seems to be part of the actin family proteins that are structural proteins released by extracellular exosomes. These proteins can block cholesterol efflux decreasing the spermatozoa capacitation and giving stabilization to these cells (PIEHL et al, 2013; BREITBART et al., 2005). It was demonstrated that the inhibition of actin functions leaded to failure of the fertilization in bulls (SPUNGIN et al. 1995), hamster eggs by human and guinea pig spermatozoa (ROGERS et al. 1989), boars (CASTELLANI-CERESA et al. 1993) and mice (BRENER et al. 2003). These findings show that actin family proteins such as uncharacterized protein (Z4YHI2) can be used in contraceptive vaccines future researches.

The proteins founded in the epididymal spermatozoa were in higher abundadnce when compared to those presents in the epididymal fluid. In this context the main proteins were IZUMO family member 4 (E2QXV4), arylsulfatase A precursor (F6PKZ1) and uncharacterized protein (F1PCE8).

The IZUMO family member 4 protein was discussed previously. The appearance of this protein in epididymal spermatozoa reinforces its importance as a possible molecule for the composition of a contraceptive vaccine.

The arylsulfatase A precursor protein is located in the plasma membrane

of the cell (CARMONA et al., 2002). This protein is acquired during the epididymal transit of the spermatozoa (WEERACHATYANUKUL et al., 2003), in a controlled way, in order to avoid premature acrosome reaction (CARMONA et al., 2002). It acts binding the sperm to the zona pelucida, which could be used to produce a contraceptive (TANTIBHEDHYANGKUL et al., 2002). Despite that, it was demonstrated that male mice knockout to arylsulfatase A, even though subfertile, could procreate (HESS et al., 1996).

The peptidase S1 domain-containing protein has close relationship with cold shock domain protein family, so that it is possible consider both families as similar domains (MIHAILOVICH et al., 2010). Besides the protection from the deleterious effects of cold chock in the cells (PHADTARE et al., 1999), the cold shock family proteins were proved to be involved in control of apoptosis of embryo stem cells and human hepatoma cells (DORMOY-RACLET et al., 2007). It is possible that the its proteolytic activity is related to the disposal of imperfect and oldest spermatozoa in epididymis.

The proteins found in increased abundance in ejaculated spermatozoa when compared to the epididymal spermatozoa were CE10 protein (Q9XSV4), kallikrein A1 (A0A1R3UGQ4), uncharacterized protein (F1PR54).

The CE10 protein is originated in the canine epididymal tail and it is part of the whey acidic protein (WAP) domain protein family (GEBHARDT et al., 1999). Its function is related to the antibacterial humoral response and innate immune response (KIRCHHOFF et al., 1991; JIN et al., 1997). Other proteins of this family like EPPIN (epididymal protease inhibitor) are being researched as a possible target for male contraception (O'RAND et al., 2006) This protein needs

more attention from researchers for a possible application in contraception vaccines development.

A kallikrein A1 is a kinin-releasing proteinase connected to blood pressure regulation, inflammation, and reproduction, since it is connected to the stimulation of sperm motility and velocity in different species (THOMPSON et al., 1981; SCHILL et al., 1979; BRATANOV et al., 1984). Although the mechanism of its functions are not clear, the kallikrein-kinin system is probably involved in the testicular regulation of spermatogenesis (SCHILL, MISKA, 1992). The kallikrein A1 family includes the kallikrein-related peptidase 3 prostate-specific antigen (PSA), which is a well know biomarker for prostate cancer (HÄRKÖNEN et al., 2011).

The uncharacterized protein (F1PR54) found in higher abundance is from the lactoferrin family. It is present in endosomes, in the plasma membrane of cells and in the extracellular space. It acts in heparin binding (ZOU et al, 1992), iron ion binding (BIRGENS et al., 1988) and lipopolysaccharide binding, which is related to antibacterial activity (YAMAUCHI et al., 1993). Lactoferrin is a very versatile molecule (SABRA, AGWA, 2020), and it should be should be better used in the field of contraception.

The up-regulated proteins in epididymal spermatozoa when compared to the ejaculated spermatozoa were fructose-bisphosphate aldolase (F1PBT3), glucose-6-phosphate isomerase (E2R2C3) and hyaluronidase (E2RCK6).

The glucose-6-phosphate isomerase and fructose-bisphosphate aldolase proteins are located in cellular cytosol and it participates of the glycolytic process. This is an important process to the maintenance of the intracellular reserve of glucose (PAUSE, SHETH, 1981) and for the future activation of

sperm cells (NAKAMURA et al., 1984; PHILLIPE et al., 1986). Despite that, these proteins are not pointed as viable molecules for the development of a contraception vaccine.

The hyaluronidase (E2RCK6) is a cell membrane protein that acts in the carbohydrate metabolic process and at the fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization (KIMURA et al., 2009; GMACHL et al., 1993; MEYERS et al., 1997). It was observed the presence of the hyaluronidase protein PH-20 (Hyaluronidase PH-20) in the plasma membrane of spermatozoa, including that from dogs, and its cell-binding activity was more pronounced in acid pH (SABEUR et al., 2002). This protein was successfully used for a contraception vaccine for male and female guinea pigs. The immunized animals presented serum with high titers of anti-PH-20 antibodies, which recognized sperm extracts and blocked the adhesion of sperm to the pellucida zone *in vitro*. Titers remained high for periods of six to 15 months (PRIMAKOFF et al., 1988). It also was demonstrated in dogs that these proteins, also called sperm adhesion molecule-1 (sperm adhesion molecule 1 - SPAM-1), located mainly in the head of the spermatozoa, have immunocontraceptive properties that can be explored (CHEEMA et al., 2013). Despite the evidence, there are still no studies on the contraceptive potential of PH-20 in the canine species.

There are many proteins related to spermatozoa, seminal plasma and epididymal fluid, and for each of them an infinity of information from which we are still just scratching the surface. Research like this that seeks to expand the knowledge necessary to better understand the paths taken by proteins in animal

reproduction may lead to the development of new techniques and products that allow the control of animal and human fertility.

5. Acknowledgements

This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001. We would also like to thank the National Biosciences Laboratory (LNBio), CNPEM, Campinas, Brazil, for supporting the mass spectrometry technique and part of the data interpretation.

6. Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

7. Referências

A. A. Moura, C. E. Souza, B. A. Stanley, D. A. Chapman, Gary J. Killian. *Journal of Proteomics*. **2010**, 73, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.005>

A. C. Csermak JR, PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa **2011**.

A. Checa, C. Bedia, J. Jaumot, *Anal. Chim. Acta* **2015**, 885, 1.

A. E. Omu, H. Dashti, S. Al-Othman. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. **1998**, 79, 179.
[https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(97\)00262-5](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(97)00262-5)

A. J. Ramsay, I. A. Ramshaw. *Reprod. Fertil. Dev.* **1997**, 9, 91. doi:
 10.1071/r96062.

A. Jacquemin-Sablon, H. Jacquemin-Sablon. *Oncogene*. **2007**, 26, 2595.

A. Ladd, G. Prabhu, Y.Y. Tsong, T. Probst, W. Chung, R.B. Thau. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, **1998**, 17, 121, 10.1111/j.1600-0897.1988.tb00215.x

A. Ledesma, J. Manes, A. Cesari, R. Alberio, F. Hozbor. *Reproduction in Domestic Animals*. **2014**, 49, 324. <https://doi.org/10.1111/rda.12279>

A. Peña, L. Quintela, P. Herradón, *Reprod. Domest. Anim.* **1999**, 23, 384.

A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 850.

A. Suri, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2005**, 5, 381.

A. Suri, *Soc. Reprod. Fertil.* **2007**, 63, 433.

B. Hess, P. Saftig, D. Hartmann, R. Coenen, R. Lullmann-Rauch, H. H. Goebel,

M. Evers, K. von Figura, R. D'Hooge, G. Nagel, P. De Deyn, C. Peters, V. Gieselmann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93,14821.

B. J. Rogers, C. Bastias, R. L. Coulson, L. D. Russell. *Journal of Andrology*. **1989**, 10, 275.

B. Philippe, G. G. Rousseau, L. Hue *FEBS Letters*. **1986**, 200, 169.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80532-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80532-4)

B. Spungin, I. Margalit, H. Breitbart. *Journal of Cell Science*. **1995**, 108, 2525.

C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods*, **2012** 9, 671.

C. Kirchhoff, I. Habben, R. Ivell, N. Krull. *Biology of Reproduction*. **1991**, 45, 350. doi: 10.1095/biolreprod45.2.350

C. P. Freitas-Dell'Aqua, P.N. Guasti, F. O. Papa, I.F. Canisso, J. A. Dell'Aqua Jr, *J. Equine Vet. Sci*. **2018**, 66, 57.

C. P. Freitas-Dell'Aqua, P.N. Guasti, G. A. Monteiro, R. R. D. Maziero, J. A. Dell'Aqua Jr, F. O. Papa, *Anim. Reprod*. **2012**, 9, 941.

C. Veaute, L.I. Furlong, M. Cameo, J.D. Harris, M. H. Vazquez-Levin, *Fertility and Sterility*, **2009**. 91, 1256. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.01.082

D. Milardi, G. Grande, F. Vincenzoni, I. Messina, A. Pontecorvi, L. De Marinis, M. Castagnola, R. Marana . *Fertil. Steril.* **2012**, v.97, 67.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.10.013>

D.B. Morton, P. A. McNulty, The effect on fertility of immunizing female sheep with ram sperm acrosin and hyaluronidase. *Reprod Immunol.* **1979**, 1, 61.

D.B. Morton, P.A. McNulty, J Reprod Immunol. **1979**, 1, 61. DOI: 10.1016/0165-0378(79)90030-5

D.M. Bollag, M.D. Rozycki, S.J. Edelstein, in Protein Methods (Eds: D.M. Bollag, M.D. Rozycki, S.J. Edelstein), Wiley-Liss, New York, USA, **1996**, Ch.6.

E. Bianchi, B. Doe, D. Goulding, G. J. Wright. *Nature.* **2014**, 508, 483.

E. Blom, In Proc.of the Symposium Internationale de Zootechnie, Milano, Italy **1972**.

E. Brener, S. Rubinstein, G. Cohen, K. Shternall, J. Rivlin, H. Breitbart. *Biology of Reproduction.* **2003**, 68, 837.

E. Carmona, W. Weerachatanukul, H. Xu, A. Fluharty, A. Anupriwan, A. Shoushtarian, K. Chakrabandhu, N. Tanphaichitr. *Biology of Reproduction.* **2002**, 66, 1820.

E. Carmona, W. Weerachatanukul, T. Soboloff, A. L. Fluharty, D. White, L. Promdee, M. Ekker, T. Berger, M. Buhr, N. Tanphaichitr. *Developmental Biology*. **2002**, 247, 182. doi:10.1006/dbio.2002.0690

E. Giacomini, B. Ura, E. Giolo, S. Lupp, M. Martinelli, R. C. Garcia, G. Ricci. *Reproductive BioMedicine Online*. **2015**, 30, 522. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.01.010>

E. Korochkina, A. Johannisson, L. Goodla, J.M.Morrell, E. Axner. *Theriogenology*, **2014**, 82, 1206, 0093-691X.

E. N. T. Meeusen, J. Walker, A. Peters, P. Pastoret, G. Jungersen, *Clin. Microbiol. Ver.* **2007**, 20, 489.

E. Natoli, L. Maragliano, G. Cariola, A. Faini, R. Bonanni, S. Caffazzo, C. Fantini, *Prev. Vet. Med.* **2006**, 77, 180.

F. F. Souza, V. H. Chirinéa, M. I. M. Martins, M. D. Lopes, *Acta Scientiae Veterinariae* **2007**, 35, 1305.

F. N. Syner, R. Kuras, K.S Moghissi. Active immunization of female rabbits with purified rabbit acrosin and effect on fertility. *Fertil and Steril*. **1979**, 32: ,468.

F. O. Papa, M.A. Alvarenga, S.D. Bicudo, M.D. Lopes, P. R. N. In Anais Congresso de Biologia Celular, Rio de Janeiro, Brasil **1986**.

F. Y. Jin, C. Nathan, D. Radzioch, A. Ding. *Cell*. **1997**, 88, 417.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81880-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81880-2)

F.N., Syner, R. Kuras, K. S. Moghissi, *Fertil and Steril*. **1979**, v.32, 468. 488437

G. B. Boe- Hansen, J. P. A. Rego, J. M. Crisp, A. A. Moura, A. S. Nouwens, Y. L. Venus, B. M. Burns, M. R. McGowana. *Animal Reproduction Science*. **2015**, 162, 20. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.003>

G. Clydesdale, J. Pekin, S. Beaton, R. J. Jackson, S. Vignarajan, C. M. Hardy. *Reproduction*. **2004**, 128, 737.

G. Frenette, J. Y. Dubé, R. R. Tremblay, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 838,

G. T. Pause, A. R. Sheth. *Indian J. Exptl. Biol*. **1981**, 19, 183.

H. Breitbart, G. Cohen, S. Rubinstein. *Reproduction*. **2005**, 129, 263. DOI:
<https://doi.org/10.1530/rep.1.00269>

H. H. Härkönen, J. M. Mattsson, J. A. E. Määttä, U. Stenman, H. Koistinen, S. Matero, B. Windshügel, A. Poso, M. Lahtela-Kakkonen. *ChemMedChem*. **2011**, 6, 2170. doi: 10.1002/cmdc.201100349

H. Mi, X. Huang, A. Muruganujan, H. Tang, C. Mills, D. Kang, P. D. Thomas, *Nucleic Acids Res*. **2017**, 45, 45.

H. S Birgens, L.O. Kristensen, N. Borregaard, H. Karle, N. E. Hansen . *Eur. J. Haematol.* **1988**, 41, 52.

I. Núñez-Martínez, J. M. Moran, F. J. Peña, *Reprod. Domest. Anim.* **2006**, 41, 408.

I.M. Adham, K. Nayernia, W. Engel. *Molecular Reproduction and Development.* **1997**, 46, 370

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE, Rio de Janeiro, Brasil, 2015.

J. D. Juárez, F. Marco-Jiménez, A. M. Talaván, X. García-Domínguez, M. P. Viudes-de-Castro, R. Lavara, J. S. Vicente. *Livestock Science.* **2019**, 232, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103894>.

J. F. Reece, in *The state of the animals III*. (Eds: D. J. Salem, A. N. Rowan) Humane Society Press, Washington, DC, USA, 2005. Ch.5.

J. F. Reece, S. K. Chawla, E. F. HIBY, L.R. HIBY, *BMC Vet. Res.* **2008**, 4, 1.

J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, N. L. FIRST, *Biol. Reprod.* **1998**, 38, 1171.

J. K. Graham, E. Kunze, R. H. Hammerstedt, *Biol. Reprod.* **1990**, 43, 55.

J. K. Voglmayr in *Regulatory Mechanisms of Male Reproductive Physiology* (EDS: C. H. Spilman et al.) Excerpta Medica, Amsterdam, 1976.

J. Nynca, M. A. Dietrich, B. Bilińska, M. Kotula-Balak, T. Kielbasa, H. Karol, A. Ciereszko. *Reproduction, Fertility and Development*. **2011**, 23, 381.
<https://doi.org/10.1071/RD10118>

J. Tantibhedhyangkul, W. Weerachatanukul, E. Carmona, H. Xu, A. Anupriwan, D. Michaud, N. Tanphaichitr *Biology of Reproduction*. **2002**, 67, 212.

J. Xia, D. S. Wishart, *Curr. Protoc. Bioinf.* **2016**, 14, 1.

J.R.A. Butler, J. T. Du Toit, *Anim. Conserv.* **2002**, 5, 29.

J.R.A. Butler, J. T. Du Toit, J. Bingham, *Biol. Cons.* **2004**, 115, 369.

K. Gebhardt, K. Ellerbrock, I. Pera, R. Ivell, and C. Kirchhoff. *Reproduction*. **1999**, 116, 391. doi: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160391>

K. Shinoda, M. Tomita, Y. Ishihama, *Bioinformatics* **2010**, 26, 576.

K. Subir, L. Smith, I. Medina-Ortiz, L. Hernandez-Encarnacion, S. Raychoudhury. *Mol Cell Biochem*, **2016**, 414, 153–169. DOI 10.1007/s11010-016-2668-3

K. T. Bratanov, M. V. Mollova, B. P. Smolev. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.* **1984**, I, 184.

K. Yamauchi, M. Tomita, T. J. Giehl, R.T. Ellison. *Infect Immun.* **1993** , 61, 719

K. Suzuki, J.J. Lareyre, D. Sánchez, G. Gutierrez, Y. Araki, R.J. Matusik, M. Orgebin-Crist. *Gene*, **2004**, 339, 49. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.027>

L. Castellani-Ceresa, M. Mattioli , G. Radaelli , B. Barboni, M. F. Brivio. *Molecular Reproduction and Development*, **1993**, 36, 203.

L. O'Donnel, P. K. Nicholls, M. K. O'Bryan, R. I. MacLachlan, P.G. Stanton, *Spermatogenesis* **2011**, 1, 14.

M. G. O'Rand, E. E. Widgren, Z. Wang, R. T. Richardson. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2006**, 250, 157.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.039>

M. Kimura, E. Kim, W. Kang, M. Yamashita, M. Saigo, T. Yamazaki, T. Nakanishi, S Kashiwabara, T. Baba. *Biology of Reproduction*. **2009**, 81, 939.
doi 10.1095/biolreprod.109.078816

M. Nakamura, A. Suzuki, S. Okinaga, K. Arai. *Dev. Growth Differ.* **1984**. 26, 11

M. Peach, N. Marsh, D. J. MacPhee, in: *Protein Electrophoresis: Methods and*

Protocols (Eds: B. T. Kurien, R. H. Scofield), Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, **2012**, Ch 4.

M. Wang, Z. Lv, J. Shi, Y. Hu, C. Xu. *Molecular Reproduction and Development*. **2009**, 76, 794. doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.21027>

N. Inoue, M. Ikawa, A. Isotani, M. Okabe. *Nature*. **2005**. 434, 234.

N. Inoue, M. Ikawa, A. Isotani, M. Okabe. *Nature*. **2005**, 434, 234.

N.R. Moudgal, N. Ravindranath, G.S. Murthy, R.R. Dighe, G.R. Aravindan, F. Martin. *J Reprod Fertil*. **1992**, 96, 91, <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960091>

P. Cassani, M. T. Beconi, C. O'Flaherty, *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 86, 163.

P. E. Visconti, H. Galantino-Homer, X. Ning, G. D. Moore, J. P. Valenzuela, C. J. Jorgez, J. G. Alvarez, G. S. Kopf. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 3235. doi: [10.1074/jbc.274.5.3235](https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.3235)

P. E. Visconti, X. Ning, M. W. Fornés, J. G. Alvarez, P. Stein, S. A. Connors, G. S. Kopf. *Dev Biol*. **1999**, 214, 429.

P. Manjunath, I. Thérien. *J. Reprod. Immunol.* **2002**, 53, 109.

P. Primakoff, *American Journal of Reproductive Immunology*, 1994, 31,208, doi:[10.1111/j.1600-0897.1994.tb00869.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1994.tb00869.x)

P. Wassarman, L. Jovine, E. Litscher, *Nat. Cell. Biol.* **2001**, 3, 59. doi: 10.1038/35055178

R. C. Jones, R. N. Murdoch, *Reprod., Fertil. Dev.* **1996**, 8, 553.

R. J. Aitken, J. K. Wingate, G. N. Du Lulius, E. A. McLaughlin, *Mol. Hum. Reprod.* **2007**, 13, 203.

R. K. Naz, *Am. J. Reprod. Immunol.* **2011**, 66, 2.

R. K. Naz, *Molecular Biology of Gametes and their Interactions*, **2008**, 75, 336.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20783>

R. K. Naz, *Molecular Biology of Gametes and their Interactions*, **2008**, 75, 336.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20783>

R. K. Naz. *Protein Science.* **2014**, 23, 857.

R.J. Aiken, M. Paterson, P.T. Koothan, P. T. British Medical Bulletin, **1993**, 49, 88. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072608

R.S, Cheema, N. Vashist, G. Bhakri, V.K. Andota. *An Scien Rep*, 2013, 7, 96.
 S. Aonuma, M. Okabe, M. Kawaguchi. *J. Reprod. Fertil.* **1978**, 53, 179.

S. Elzanaty, J. Erenpreiss, C. Becker. *Andrologia.* **2007**, 39, 60.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00764.x>

S. K. Gupta, B. Bhandari. *Asian Journal of Andrology*. **2011**, 13, 97. doi: 10.1038/aja.2010.72

S. Millar, S. Chamow, A. Baur, C. Oliver, F. Robey, J. Dean, *Science*, 1989, 246, 935. doi:10.1126/science.2479101

S. Phadtare, J. Alsina, M. Inouye. *Current Opinion in Microbiology*. **1999**. 2, 175. doi:10.1016/s1369-5274(99)80031-9

S. S. Baker, R. A. Cardullo, C. D. Thaler, *Biol. Reprod.* **2002**, 66, 57.

S. Sabra, M. M. Agwa *International Journal of Biological Macromolecules*. **2020**, 164, 1046. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.167>

S. Varesi, V. Verochi, M. Faustini, G.C. Luvoni. *Acta Vet. Scand.*, **2013**, 1, <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-17>

S. Zou, C. E. Magura, W. I. Hurley. *Comp. Biochem. Physiol.* **1992**, 103, 889.

S. Fouchécourt, J.J. Lareyre, P. Chaurand, B.B. Dague, K. Suzuki, D.E. Ong, G. E. Olson, R. J. Matusik, R. M. Caprioli, M. Orgebin-Crist. *Endocrinology*, **2003**, 144, 887. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220932>

S.A. Young, H. Miyata, Y. Satouh, M. Muto, M. R. Larsen, R. J. Aitken, M. A. Baker, M. Ikawa. *Reproduction*. **2016**, 152, 665. doi: 10.1530/REP-16-0150

SABEUR, K.; FORISTALL, K.; BALL, B.A. Characterization of PH-20 in canine spermatozoa and testis. *Theriogenology*, v.57, p.977-987, 2002

T. Peters, In *The Plasma Proteins: Structure, Function, and Genetic Control*. (Ed: F. W. Putnam) Academic Press, New York, USA, 1975.

T. Baba, Y. Niida, Y. Michikawa, S. Kashiwabara, K. Kodaira, M. Takenaka, N. Kohno, G.L. Gerton, Y. Arai. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269,10133.

U. Ohto, H. Ishida, E. Krayukhina, S. Uchiyama, N. Inoue, T. Shimizu. *Nature*. **2016**, 534, 566.

V. Dormoy-Raclet, J Markovits, Y. Malato, S. Huet, P. Lagarde, D. Montaudon,

V. González-Cadavida, J. A. M. Martins, F. B. Moreno, T. S. Andrade, A. C. L. Santos, A. C. O. Monteiro-Moreira, R. A. Moreira, A. A. Moura. *Theriogenology*. **2014**, 82, 697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.024>

V. González-Cadavid, J. A. M. Martins, F. B. Moreno, T. S. Andrade, A. C. L. Santos, A. C. O. Monteiro-Moreira, R. A. Moreira, A. A. Moura. *Theriogenology*. **2014**, 82, 697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.024>

W. B. Schill, W. Miska. *Andrologia*. **1992**, 24, 69.

W. Thompson, A. J. Traub, J. C. Earnshaw, *Arch. Androl.* **1981**. 5, 17.

W. Weerachatanukul, H. Xu, A. Anupriwan, E. Carmona, M. Wade, L. Herno, S. M. Silva, P. Rippstein, P. Sobhon, P. Sretarugsa, N. Tanphaichitr. *Biology of Reproduction*. **2003**, 69, 1183. doi 10.1095/biolreprod.102.010231

W.B. Schill, W. Pritsch, G. Preissler, G. *Int. J. Fertil.* **1979**, 24, 27.

CAPÍTULO 3

ANEXO 1 - Dados das proteínas *up-regulated* nos espermatozoides ejaculados quando comparadas as do plasma seminal pela análise de *fold change* e test-t.

ID	NOME	GENE	FUNÇÃO MOLECULAR	PROCESSO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
F6V5L4	Acrosin*	ACR	mannose binding; serine-type endopeptidase activity	acrosome reaction; activation of adenylate cyclase activity; binding of sperm to zona pellucida; penetration of zona pellucida	acrosomal vesicle; protein-containing complex
E2RNS8	Acrosin binding protein*	ACRBP	N/A	acrosome assembly; fertilization	Other locations: acrosomal vesicle
F1PS44	Acrosomal vesicle protein 1	ACRV1	N/A	N/A	Other locations: acrosomal vesicle
F6PKZ1	Arylsulfatase A precursor	ARSA	arylsulfatase activity	binding of sperm to zona pellucida	Plasma Membrane; Other locations: integral component of membrane.
K0J5K2	Beta-N-acetylhexosaminidase beta subunit, exons 2-14 (Fragment)	HEXB	beta-N-acetylhexosaminidase activity	carbohydrate metabolic process	N/A
F1PCH3	Enolase 1	ENO1	magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity	glycolytic process	Cytosol: phosphopyruvate hydratase complex
E2RC89	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDHS	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity; NAD binding; NADP binding	glucose metabolic process; glycolytic process	Cytosol
E2RCK6	Hyaluronidase*	SPAM1	hyaluronoglucosaminidase activity	carbohydrate metabolic process; fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization	N/A
F1PF34	Interleukin 4 induced*	IL4I1	L-amino-acid oxidase activity; oxidoreductase activity	cellular amino acid catabolic process	N/A
E2QXV4	IZUMO family member 4*	IZUMO4	Acrosome Reaction and Sperm:Oocyte Membrane Binding	N/A	N/A

B6VH75	Sperm acrosome membrane-associated protein 3	SPACA3	<u>lysozyme activity</u>	defense response to Gram-negative bacterium; defense response to Gram-positive bacterium; fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization; sperm-egg recognition	extracellular region Source; Other locations: acrosomal matrix Source; acrosomal membrane
J9NZ99	Uncharacterized protein	ROPN1	N/A	cilium organization; flagellated sperm motility; protein localization to cilium; regulation of protein phosphorylation; sperm capacitation	Other locations: cytoplasm; sperm cytoplasmic droplet; sperm principal piece
J9P314	Uncharacterized protein*	N/A	structural molecule activity	N/A	Cytoskeleton: intermediate filament
F1PNI3	Uncharacterized protein	N/A	fructose-bisphosphate aldolase activity	fructose 1,6-bisphosphate metabolic process; glycolytic process	Cytosol
F1PZ03	Uncharacterized protein*	LOC609513	N/A	N/A	Plasma Membrane
F1P704	Zona pellucida binding protein	ZPBP	N/A	binding of sperm to zona pellucida	Extracellular region or secreted

Dados obtidos em <https://www.uniprot.org/>

* Variable importance in projection (VIP) escore

ANEXO 2 - Dados das proteínas *up-regulated* no plasma seminal quando comparadas as dos espermatozoides ejaculados pela análise de *fold change* e test-t.

ID	NOME	GENE	FUNÇÃO MOLECULAR	PROCESSO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
F1PF95	Alkaline phosphatase *	ALPL	alkaline phosphatase activity; pyrophosphatase activity	cellular response to organic cyclic compound; developmental process involved in reproduction; endochondral ossification; response to antibiotic; response to vitamin D	Extracellular region or secreted: extracellular matrix; extracellular membrane-bounded organelle. Plasma Membrane.
F1PQX8	Carboxylic ester hydrolase	CES5A	carboxylic ester hydrolase activity; sterol esterase activity; triglyceride lipase activity	lipid catabolic process	Extracellular region or secreted: extracellular space
E2QYU2	Clusterin *	CLU	amyloid-beta binding; low-density lipoprotein particle receptor binding; misfolded protein binding; protein-containing complex binding; tau protein binding; ubiquitin protein ligase binding; unfolded protein binding	cell morphogenesis; central nervous system myelin maintenance; chaperone-mediated protein complex assembly; chaperone-mediated protein folding; immune complex clearance; 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 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	Cytoskeleton. Cytosol. Endoplasmic reticulum: perinuclear endoplasmic reticulum lumen. Extracellular region or secreted: spherical high-density lipoprotein particle. Mitochondrion: mitochondrial inner membrane. Nucleus. Other locations: apical dendrite; cell periphery; cell surface; neurofibrillary tangle; synapse
F1PTY1	Keratin, type II cytoskeletal 1 *	KRT1	carbohydrate binding; protein heterodimerization activity; structural constituent of epidermis	complement activation, lectin pathway; establishment of skin barrier; negative regulation of inflammatory response; peptide cross-linking; protein heterotetramerization S	Cytoskeleton: keratin filament. Plasma Membrane: cornified envelope

F1PAR9	NPC intracellular cholesterol transporter 2 *	NPC intracellular cholesterol transporter 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	cholesterol binding; cholesterol transporter activity; sterol binding	cholesterol efflux; intracellular cholesterol transport; sterol transport
F1PLV2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIB	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	chaperone-mediated protein folding; protein peptidyl-prolyl isomerization	Other locations: protein-containing complex
Q9XS65	Prostaglandin-H2 D-isomerase *	PTGDS	prostaglandin-D synthase activity; retinoid binding; small molecule binding	prostaglandin biosynthetic process; regulation of circadian sleep/wake cycle, sleep	Endoplasmic reticulum: rough endoplasmic reticulum. Extracellular region or secreted: extracellular region; extracellular space. Golgi apparatus. Nucleus: nuclear membrane. Other locations: perinuclear region of cytoplasm.
E2RG75	Ribonuclease A K1	RNA5E9	nucleic acid binding; ribonuclease activity		
F2Z4Q6	Serum albumin *	ALB	chaperone binding; DNA binding; enterobactin 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. Other locations: protein-containing complex
E2R6E0	Uncharacterized protein *	PTGDS	small molecule binding		
E2RCT1	Uncharacterized protein	N/A	peptidase inhibitor activity		Extracellular region or secreted: extracellular region
F1PSX2	Uncharacterized protein	N/A	antigen binding; immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway; complement activation, classical pathway; defense response to bacterium; innate immune response; phagocytosis, engulfment; phagocytosis, recognition; positive regulation of B cell activation	Extracellular region or secreted: immunoglobulin complex, circulating. Plasma Membrane: external side of plasma membrane
F1PQL8	Uncharacterized protein *	ACTG1			
F1PDT8	WAP four-disulfide core domain protein 2	WFDC2	aspartic-type endopeptidase inhibitor activity; serine-type endopeptidase inhibitor activity		Extracellular region or secreted: extracellular region

Dados obtidos em <https://www.uniprot.org/>

* Variable importance in projection (VIP) escore

ANEXO 3 - Proteínas *up-regulated* nos espermatozoides do epidídimo quando comparadas as do fluido epididimário pela análise de *fold change* e test-t.

ID	NOME	GENE	FUNÇÃO MOLECULAR	PROCESSO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
F6V5L4	Acrosin *	ACR	mannose binding; serine-type endopeptidase activity	acrosome reaction; activation of adenylate cyclase activity; binding of sperm to zona pellucida; penetration of zona pellucida	acrosomal vesicle; protein-containing complex
E2RNS8	Acrosin binding protein	ACRBP		acrosome assembly; fertilization	Other locations: acrosomal vesicle
F1PS44	Acrosomal vesicle protein 1*	ACRV1			Other locations: acrosomal vesicle
F6PKZ1	Arylsulfatase A precursor *	ARSA	arylsulfatase activity	binding of sperm to zona pellucida	Plasma Membrane; Other locations: integral component of membrane.
A0A1B1X469	ATP synthase subunit alpha	N/A	ATP binding; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP synthesis coupled proton transport	Other locations: proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
F1PCG1	Chromosome 17 C1orf56 homolog *	C17H1orf56		regulation of cell population proliferation	
A0A060GWV3	Cytochrome c oxidase subunit 2	COX2	copper ion binding; cytochrome-c oxidase activity	Electron transport, Respiratory chain	Mitochondrion: mitochondrial inner membrane; Other locations: integral component of membrane; respirasome
F1PBT3	Fructose-bisphosphate aldolase *	ALDOA	fructose-bisphosphate aldolase activity	fructose 1,6-bisphosphate metabolic process; glycolytic process	Cytosol; Other locations: integral component of membrane.
E2R2C3	Glucose-6-phosphate isomerase *	GPI	glucose-6-phosphate isomerase activity; intramolecular transferase activity; monosaccharide binding	erythrocyte homeostasis; gluconeogenesis; glucose 6-phosphate metabolic process; glucose homeostasis; glycolytic process; in utero embryonic development; mesoderm formation	Cytosol; Plasma Membrane: ciliary membrane

E2RCK6	Hyaluronidase *	SPAM1	hyaluronoglucosaminidase activity	carbohydrate metabolic process; fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization	
F1PF34	Interleukin 4 induced *	IL4I1	L-amino-acid oxidase activity; oxidoreductase activity	cellular amino acid catabolic process	
E2QXV4	IZUMO family member 4 *	IZUMO4	Acrosome Reaction and Sperm:Oocyte Membrane Binding		
F6UM65	Izumo sperm-egg fusion 1	IZUMO1	signaling receptor binding	fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization; sperm-egg recognition	Other locations: integral component of membrane
E2RLK0	L-lactate dehydrogenase	LDHC	L-lactate dehydrogenase activity	ATP biosynthetic process; carbohydrate metabolic process; flagellated sperm motility; lactate biosynthetic process from pyruvate; lactate oxidation	Other locations: cytoplasm; motile cilium
E2QS13	Parkinsonism associated deglycase	PARK7	androgen receptor binding; cupric ion binding; cuprous ion binding; cytokine binding; kinase binding; L-dopa decarboxylase activator activity; mercury ion binding; mRNA binding; peptidase activity; peroxiredoxin 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;	adult locomotory behavior; cellular response to glyoxal; cellular response to hydrogen peroxide; detoxification of copper ion; detoxification of mercury ion; DNA repair; dopamine uptake involved in synaptic transmission; enzyme active site formation via L-cysteine sulfinic acid; glucose homeostasis; glutathione deglycation; guanine deglycation, glyoxal removal; guanine deglycation, methylglyoxal removal; hydrogen peroxide metabolic process; insulin secretion; membrane depolarization; membrane hyperpolarization; mitochondrion organization; 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	Cytosol. Endoplasmic reticulum. Mitochondrion: mitochondrial intermembrane space; mitochondrial matrix; mitochondrial respiratory chain complex I. Nucleus: nucleus; PML body. Other locations: cell body; chromatin; neuron projection; perinuclear region of cytoplasm; presynapse.

				from nucleus; negative regulation of protein K48-linked deubiquitination; negative regulation of protein kinase activity; negative regulation of protein sumoylation; negative regulation of reactive oxygen species biosynthetic process; 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 acute inflammatory response to antigenic stimulus; 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 NAD(P)H oxidase activity; positive regulation of oxidative phosphorylation uncoupler activity; positive regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; 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 reactive oxygen species biosynthetic process; 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
H9GW55	Phosphoglycerate mutase	PGAM2	bisphosphoglycerate mutase activity; phosphoglycerate mutase activity	glycolytic process; Notch signaling pathway; striated muscle contraction

E2QZV5	Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha	PRKAR1A	3',5'-cyclic-GMP phosphodiesterase activity; cAMP binding; cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity; cAMP-dependent protein kinase regulator activity; protein domain specific binding; protein kinase A catalytic subunit binding; ubiquitin protein ligase binding	cardiac muscle cell proliferation; cGMP-mediated signaling; mesoderm formation; negative regulation of activated T cell proliferation; negative regulation of cAMP-dependent protein kinase activity; sarcomere organization	Cytoskeleton: axoneme. Cytosol. Plasma Membrane: immunological synapse; plasma membrane raft. Other locations: cAMP-dependent protein kinase complex; glutamatergic synapse; neuromuscular junction; nucleotide-activated protein kinase complex Mitochondrion; Plasma Membrane; Other locations: integral component of membrane; lipid droplet; midbody
F1Q2B1	Saccharopine dehydrogenase (putative)	SCCPDH	oxidoreductase activity	glycolipid biosynthetic process	
B6VH75	Sperm acrosome membrane-associated protein 3*	SPACA3	<u>lysozyme activity</u>	defense response to Gram-negative bacterium; defense response to Gram-positive bacterium; fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization; sperm-egg recognition acetylcholine-mediated vasodilation involved in regulation of systemic arterial blood pressure; age-dependent response to oxidative stress; detection of oxygen; erythropoiesis; differentiation; glutathione metabolic process; heart development; hemopoiesis; 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 fat cell differentiation; negative regulation of fibroblast proliferation; neuron development; positive regulation of nitric oxide biosynthetic process; post-embryonic development; regulation of catalytic activity; regulation of mitochondrial membrane potential; regulation of transcription by RNA polymerase II; release of cytochrome c from mitochondria; respiratory electron transport chain; response to activity; response to axon injury; response to gamma radiation; response to hydrogen peroxide; response to hyperoxia; superoxide anion generation.	extracellular region Source; Other locations: acrosomal matrix Source; acrosomal membrane
E2RSF2	Superoxide dismutase	SOD2	manganese ion binding; metal ion binding; superoxide dismutase activity		Mitochondrion
F1PE21	Tubulin alpha chain	LOC477570	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization; mitotic cell cycle	Cytoskeleton: microtubule; Other locations: cytoplasm

L7N0I7	Tubulin beta chain *	TUBB4B	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization; mitotic cell cycle	Cytoskeleton
F1PCE8	Uncharacterized protein *	LOC475521	serine-type endopeptidase activity	proteolysis	Extracellular region or secreted
F1PNI3	Uncharacterized protein	N/A	fructose-bisphosphate aldolase activity	fructose 1,6-bisphosphate metabolic process; glycolytic process	Cytosol
J9NZ99	Uncharacterized protein *	ROPN1		cilium organization; flagellated sperm motility; protein localization to cilium; regulation of protein phosphorylation; sperm capacitation	Other locations: cytoplasm; sperm cytoplasmic droplet; sperm principal piece
F1PM13	Uncharacterized protein	N/A			Other locations: integral component of membrane
F1PZ03	Uncharacterized protein3 *	LOC609513			Plasma Membrane

Dados obtidos em <https://www.uniprot.org/>

* Variable importance in projection (VIP) score

ANEXO 4 - Dados das proteínas *up-regulated* no fluido epididimário quando comparadas as dos espermatozoides do epidídimo pela análise de *fold change* e test-t.

ID	NOME	GENE	FUNÇÃO MOLECULAR	PROCESSO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
K0J5K2	Beta-N-acetylhexosaminidase beta subunit, exons 2-14 (Fragment)	HEXB	beta-N-acetylhexosaminidase activity	carbohydrate metabolic process	
F1PQX8	Carboxylic ester hydrolase	CES5A	carboxylic ester hydrolase activity; sterol esterase activity; triglyceride lipase activity	lipid catabolic process	Extracellular region or secreted: extracellular space
E2RCP0	Epididymal sperm-binding protein 1	ELSPBP1			
A0A1K0GGH0	Globin A2	GLNA2	heme binding; metal ion binding; oxygen binding; oxygen carrier activity	Oxygen transport	Cytosol: hemoglobin complex
F1PJ71	Glutathione peroxidase	GPX5	Glutathione peroxidase	glutathione peroxidase activity	response to oxidative stress
F1PAR9	NPC intracellular cholesterol transporter 2	NPC2	cholesterol binding; cholesterol transporter activity; sterol binding	cholesterol efflux; intracellular cholesterol transport; sterol transport	Other locations: cell
E2RG75	Ribonuclease A K1	RNASE9	nucleic acid binding; ribonuclease activity		
F2Z4Q6	Serum albumin	ALB	chaperone binding; DNA binding; enterobactin 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. Other locations: protein-containing complex
F1PLT8	Sulfhydryl oxidase	QSOX1	FAD binding; flavin-linked sulfhydryl oxidase activity; protein disulfide isomerase activity	cell redox homeostasis; extracellular matrix assembly; negative regulation of macroautophagy	Extracellular region or secreted: extracellular exosome; extracellular space; intercellular bridge. Golgi apparatus: integral component of Golgi membrane

E2R6E0	Uncharacterized protein	PTGDS	small molecule binding		
E2RCT1	Uncharacterized protein	N/A	peptidase inhibitor activity		Extracellular region or secreted: extracellular region
J9JHF7	Uncharacterized protein	LOC100855540	heme binding; iron ion binding; organic acid binding; oxygen binding; oxygen carrier activity	cellular oxidant detoxification; hydrogen peroxide catabolic process	Cytosol: hemoglobina. Other locations: haptoglobin-hemoglobin complex
F1PQL8	Uncharacterized protein	ACTG1			
F1P704	Zona pellucida binding protein *	ZPBP		binding of sperm to zona pellucida	Extracellular region or secreted

Dados obtidos em <https://www.uniprot.org/>

* Variable importance in projection (VIP) escore

ANEXO 5 - Proteínas *up-regulated* nos espermatozoides ejaculados quando comparadas as dos espermatozoides do epidídimo pela análise de *fold change* e test-t.

ID	NOME	GENE	FUNÇÃO MOLECULAR	PROCESSO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
Q9XSV4	CE10 protein *	ce10	peptidase inhibitor activity		Extracellular region or secreted
A0A1R3UGQ4	Kallikrein A1 *	KLNA1	<u>serine-type endopeptidase activity</u>	antibacterial humoral response; antifungal humoral response; antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide; bone morphogenesis; defense response to Gram-negative bacterium; innate immune response in mucosa; killing of cells of other organismo; membrane disruption in other organismo; negative regulation by host of viral process; negative regulation of ATPase activity; negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity; negative regulation of lipopolysaccharide-mediated signaling pathway; negative regulation of single-species biofilm formation in or on host organismo; negative regulation of viral genome replication; positive regulation of chondrocyte proliferation; positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; positive regulation of osteoblast differentiation; positive regulation of osteoblast proliferation; positive regulation of toll-like receptor 4 signaling pathway; regulation of tumor necrosis factor production.	Extracellular region or secreted; extracellular space; Other locations: cell surface; other organism cell membrane; protein-containing complex; specific granule
F1PR54	Uncharacterized protein F1PR54 *	LTF	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; heparin binding; iron ion binding; lipopolysaccharide binding; protein serine/threonine kinase activator activity; serine-type endopeptidase activity		

Dados obtidos em <https://www.uniprot.org/>

* Variable importance in projection (VIP) score

ANEXO 6 - Proteínas *up-regulated* nos espermatozoides do epidídimo quando comparadas as dos espermatozoides ejaculados pela análise de *fold change* e test-t.

ID	NOME	GENE	FUNÇÃO MOLECULAR	PROCESSO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
A0A1B1X469	ATP synthase subunit alpha	N/A	ATP binding; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP synthesis coupled proton transport	Other locations: proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
F1PCG1	Chromosome 17 C1orf56 homolog *	C17H1orf56		regulation of cell population proliferation	
A0A060GWV3	Cytochrome c oxidase subunit 2 *	COX2	copper ion binding; cytochrome-c oxidase activity	Electron transport, Respiratory chain	Mitochondrion: mitochondrial inner membrane; Other locations: integral component of membrane; respirasome
F1PBT3	Fructose-bisphosphate aldolase *	ALDOA	fructose-bisphosphate aldolase activity	fructose 1,6-bisphosphate metabolic process; glycolytic process	Cytosol; Other locations: integral component of membrane.
E2R2C3	Glucose-6-phosphate isomerase *	GPI	glucose-6-phosphate isomerase activity; intramolecular transferase activity; monosaccharide binding	erythrocyte homeostasis; gluconeogenesis; glucose 6-phosphate metabolic process; glucose homeostasis; glycolytic process; in utero embryonic development; mesoderm formation	Cytosol; Plasma Membrane: ciliary membrane
E2RCK6	Hyaluronidase *	SPAM1	hyaluronoglucosaminidase activity	carbohydrate metabolic process; fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization	
F6UM65	Izumo sperm-egg fusion 1 *	IZUMO1	signaling receptor binding	fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization; sperm-egg recognition	Other locations: integral component of membrane
E2RLK0	L-lactate dehydrogenase	LDHC	L-lactate dehydrogenase activity	ATP biosynthetic process; carbohydrate metabolic process; flagellated sperm motility; lactate biosynthetic process from pyruvate; lactate oxidation	Other locations: cytoplasm; motile cilium

E2QS13	Parkinsonism associated deglycase	PARK7	androgen receptor binding; cupric ion binding; cuprous ion binding; cytokine binding; kinase binding; L-dopa decarboxylase activator activity; mercury ion binding; mRNA binding; peptidase activity; peroxiredoxin 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;	adult locomotory behavior; cellular response to glyoxal; cellular response to hydrogen peroxide; detoxification of copper ion; detoxification of mercury ion; DNA repair; dopamine uptake involved in synaptic transmission; enzyme active site formation via L-cysteine sulfinic acid; glucose homeostasis; glutathione deglycation; guanine deglycation, glyoxal removal; guanine deglycation, methylglyoxal removal; hydrogen peroxide metabolic process; insulin secretion; membrane depolarization; membrane hyperpolarization; mitochondrion organization; 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 reactive oxygen species biosynthetic process; 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 acute inflammatory response to antigenic stimulus; 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 NAD(P)H oxidase activity; positive	Cytosol. Endoplasmic reticulum. Mitochondrion: mitochondrial intermembrane space; mitochondrial matrix; mitochondrial respiratory chain complex I. Nucleus: nucleus; PML body. Other locations: cell body; chromatin; neuron projection; perinuclear region of cytoplasm; presynapse.
--------	-----------------------------------	-------	--	--	--

				regulation of oxidative phosphorylation uncoupler activity; positive regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; 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 reactive oxygen species biosynthetic process; 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 glycolytic process; Notch signaling pathway; striated muscle contraction	
H9GW55	Phosphoglycerate mutase *	PGAM2	bisphosphoglycerate mutase activity; phosphoglycerate mutase activity		
E2QZV5	Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha *	PRKAR1A	3',5'-cyclic-GMP phosphodiesterase activity; cAMP binding; cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity; cAMP-dependent protein kinase regulator activity; protein domain specific binding; protein kinase A catalytic subunit binding; ubiquitin protein ligase binding	cardiac muscle cell proliferation; cGMP-mediated signaling; mesoderm formation; negative regulation of activated T cell proliferation; negative regulation of cAMP-dependent protein kinase activity; sarcomere organization	Cytoskeleton: axoneme. Cytosol. Plasma Membrane: immunological synapse; plasma membrane raft. Other locations: cAMP-dependent protein kinase complex; glutamatergic synapse; neuromuscular junction; nucleotide-activated protein kinase complex Mitochondrion; Plasma Membrane; Other locations: integral component of membrane; lipid droplet; midbody
F1Q2B1	Saccharopine dehydrogenase (putative)	SCCPDH	oxidoreductase activity	glycolipid biosynthetic process	
E2RSF2	Superoxide dismutase *	SOD2	manganese ion binding; metal ion binding; superoxide dismutase activity	acetylcholine-mediated vasodilation involved in regulation of systemic arterial blood pressure; age-dependent response to oxidative stress; detection of oxygen; erythrophore differentiation; glutathione metabolic process; heart development; hemopoiesis; intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage; intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress; iron ion homeostasis; liver development; locomotory	Mitochondrion

				behavior; negative regulation of fat cell differentiation; negative regulation of fibroblast proliferation; neuron development; positive regulation of nitric oxide biosynthetic process; post-embryonic development; regulation of catalytic activity; regulation of mitochondrial membrane potential; regulation of transcription by RNA polymerase II; release of cytochrome c from mitochondria; respiratory electron transport chain; response to activity; response to axon injury; response to gamma radiation; response to hydrogen peroxide; response to hyperoxia; superoxide anion generation.	
F1PE21	Tubulin alpha chain*	LOC477570	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization; mitotic cell cycle	Cytoskeleton: microtubule; Other locations: cytoplasm
L7N0I7	Tubulin beta chain*	TUBB4B	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization; mitotic cell cycle	Cytoskeleton
F1PM13	Uncharacterized protein	N/A			Other locations: integral component of membrane
F1PZ03	Uncharacterized protein *	LOC609513			Plasma Membrane

Dados obtidos em <https://www.uniprot.org/>

* Variable importance in projection (VIP) escore