



CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSO

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**MATURAÇÃO ESPERMÁTICA NO EPIDÍDIMO SUÍNO: ANÁLISE
PROTEÔMICA DO ESPERMATOZOIDE E REGULAÇÃO HORMONAL DA
EXPRESSÃO DE β -DEFENSINAS**

Augusto Weber

Lajeado, novembro de 2016

Augusto Weber

**MATURAÇÃO ESPERMÁTICA NO EPIDÍDIMO SUÍNO: ANÁLISE
PROTEÔMICA DO ESPERMATOZOIDE E REGULAÇÃO HORMONAL DA
EXPRESSÃO DE β -DEFENSINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa Produção Primária de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante
Filho

Lajeado, novembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ilca e Roque, pelo apoio durante toda a jornada, desde as séries iniciais até o término do mestrado, não medindo esforços para auxiliar no que fosse preciso. Agradeço, em especial, a minha irmã Ane Weber (*in memoriam*), que onde quer que esteja, sempre me apoiou e serviu de exemplo pessoal e profissional. Agradeço a namorada Márcia, pela compreensão, apoio incondicional, confiança e parceria.

Ao grupo de Pesquisa em Reprodução Animal pelo apoio técnico durante a realização deste trabalho, em especial Jayse Alves e Laura Espíndola Argenti. Ao professor e orientador Ivan Cunha Bustamante Filho, que compartilhou do desafio de cursar o mestrado paralelamente ao serviço público, auxiliando no planejamento e na execução dos experimentos. Aos colaboradores do trabalho, professores Lucélia e Walter do Centro Universitário UNIVATES e ao professor John R. Yates III, do Scripps Research Institute.

À Associação dos Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul, Cooperativa Languiru e BRF, pela provisão dos tecidos utilizados no estudo. A FUVATES, CNPQ e FAPERGS pelo aporte financeiro e ao Centro Universitário UNIVATES e Scripps Research Institute pela infraestrutura e equipamentos disponibilizados durante os experimentos.

Ao Centro Universitário UNIVATES, bem como aos seus professores, pela oportunidade de aprendizado e pelos conhecimentos repassados durante a Pós-Graduação. De modo geral, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

A maturação espermática, que ocorre no epidídimo, é etapa essencial para a aquisição de características necessárias a fertilização *in vivo*. Durante o transito epididimário o espermatozoide sofre uma série de alterações que transformam uma célula imatura, com pouca capacidade fertilizante, em uma célula madura, apto a fertilizar. O conhecimento das proteínas presentes no espermatozoide de suínos obtidos da cauda do epidídimo e a relação de β -defensinas, proteínas relacionadas com imunidade e reprodução, em testículo e epidídimo de suínos imunizados contra o GnRH, pode esclarecer os mecanismos envolvidos na maturação epididimária. O presente trabalho foi subdividido em dois experimentos, sendo o primeiro relacionado com a proteômica do espermatozoide suíno retirado da cauda do epidídimo, com objetivo de identificar e descrever as proteínas, bem como a relação destas proteínas em vias metabólicas. Foram identificadas 1681 proteínas, através da ferramenta MudPIT, sendo realizadas análises de bioinformática para a descrição dos processos biológicos, componentes celulares e função molecular, bem como foram agrupadas as proteínas em mapas metabólicos. A identificação destas 1681 proteínas permite a formação de um banco de dados para posteriores pesquisas aplicadas. O segundo experimento, que trata da expressão das β -defensinas em epidídimo de suínos imunizados contra o GnRH, objetiva compreender a expressão gênica de β -defensinas em modelo animal de depleção androgênica. Os dados obtidos indicam que a expressão das β -defensinas é maior nos animais imunizados contra o GnRH, sugerindo assim que as β -defensinas sejam andrógeno dependentes. Estes resultados podem ser utilizados no desenvolvimento de biotecnologias aplicadas a reprodução animal, auxiliando assim na melhoria dos índices produtivos e reprodutivos.

Palavras-chave: suínos, reprodução, epidídimo, proteômica, defensinas.

ABSTRACT

Sperm maturation, which occurs on epididymis, is essential to the acquisition of needed characteristics for *in vivo* fertilization. During the epididymal transit, spermatozoa undergo a series of alterations that transform an immature cell with few fertilizing ability, in a mature cell, with fertilization capacity. The knowledge of proteins presents on boar spermatozoa taken from epididymis cauda and the relationship of β -defensins, proteins related to immunity and reproduction, on testis and epididymis of boars immunized against GnRH, can explain the mechanisms involved on epididymal maturation. The present work was subdivided in two experiments, being the first related with proteomics of boar spermatozoa taken from epididymis cauda, which aim to identify and describe the proteins, besides your relationship with metabolic routes. Were identified 1681 proteins, through MudPIT technology, carried out analyzes of biological process, cellular component and molecular function, grouping this proteins in metabolic routes. The identification of 1681 proteins allow a formation of databank for applied future researches. The second experiment, expression of β -defensins in testis and epididymis of boars immunized against GnRH, aim to understand the genic expression of β -defensins in animal model of androgen depletion. This data indicate that expression of β -defensins is higher on immunized boars, suggesting that porcine β -defensins are dependent of androgens. This results can be utilized to development animal reproductive applied biotechnologies, helping to improve productive and reproductive indices.

Keywords: pigs, reproduction, epididymis, proteomics, defensins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática e anatômica do testículo e do epidídimo de suínos.	17
Figura 2 - Pontes de ligação entre as cisteínas presentes em HNP3 (α -defensina), HBD2 (β -defensina) e RTD1 (θ -defensina).....	28
Figura 3 - Distribuição das proteínas identificadas (A) e distribuição de Venn entre as corridas (B).....	53
Figura 4 – Função molecular das proteínas obtida por análise de ontologia gênica através do software Blast2GO identificadas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo de suínos.	56
Figura 5 – Proteínas relacionados com componentes celulares obtida por análise de ontologia gênica através do software Blast2GO identificadas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo de suínos.....	57
Figura 6 – Processos biológicos obtida por análise de ontologia gênica através do software Blast2GO identificadas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo de suínos.	57
Figura 7 - Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica da β -defensina suína 3 (pBD3) em testículo e epidídimo de suínos.	59
Figura 8. Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica da β -defensina suína 4 (pBD4) em testículo e epidídimo de suínos..	59
Figura 9 – Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica da proteína epididimária 2C (pEP2C) em testículo e epidídimo de suínos.....	60
Figura 10 - Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica da β -defensina suína 125 (pBD125) em testículo e epidídimo de suínos.	60
Figura 11- Descrição de algumas proteínas envolvidas com diferentes processos fisiológicos associadas a função e viabilidade do espermatozoide. A categorização foi baseada na ontologia gênica e revisão bibliográfica das proteínas citadas.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metodologias utilizadas em estudos de depleção androgênica em diferentes espécies com tempo de privação androgênica empregada.	43
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para os genes de β -defensinas suínas.....	51
Tabela 3 - Listagem das 10 proteínas mais abundantes encontradas no espermatozoide suíno retirado da cauda do epidídimo. São apresentados dados de quantificação da proteína, bem como termos de ontologia gênica obtidas pelo software Blast2GO e as análises de bioinformática com os programas TargetP, SignalP e TMHMM.	54

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Proteínas relacionadas com a glicólise, metabolismo de frutose e manose e metabolismo da galactose. As proteínas são apresentadas com informações obtidas por análise de bioinformática.....	100
Apêndice B - Proteínas relacionados com oxidação fosforilativa. As proteínas são apresentadas com informações obtidas por análise de bioinformática.....	104
Apêndice C - Proteínas relacionadas com metabolismo de aminoácidos. As proteínas são apresentadas com informações obtidas por análise de bioinformática.....	106
Apêndice D - Proteínas relacionadas com metabolismo de esteroides. As proteínas são apresentadas com informações obtidas por análise de bioinformática.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP – proteína ligadora de andrógeno

ACRBP – *Acrosin Binding Protein*

ACSURS – Associação de criadores de suínos do Rio Grande do Sul

AMPK – *Protein AMP kinase*

cDNA – DNA complementar

EROs – espécies reativas de oxigênio

FSH – hormônio folículo estimulante

GAPD – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

HSP – *Heat Shock Protein*

IA – inseminação artificial

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LH – hormônio luteinizante

LPS - lipopolissacarídeo

MudPIT – *Multidimensional Protein Identification Technology*

pBD* – porcine beta defensina (β -defensina suína)

PCR – reação em cadeia da polimerase

pEP2C – epididymis protein 2 splicing variant C (proteína epididimária 2C)

PGK1 – *phosphoglycerate kinase 1*

PGRP – proteína de reconhecimento de peptídeoglicanos

qPCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA – ácido ribonucleico

ZPBP – *Zona pelúcida binding protein*

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Objetivos.....	14
1.2 Justificativa	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 O Epidídimo	16
2.1.1 Anatomia Epididimária	16
2.1.2 Fisiologia Epididimária	19
2.2 Proteômica espermática	23
2.3 β-Defensinas	25
2.3.1 Peptídeos antimicrobianos	25
2.3.2 Classificação	27
2.3.3 β -defensinas	29
2.3.4 O suíno imunocastrado como modelo animal para estudo do hipogonadismo	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Experimento 1 – Descrição das proteínas encontradas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo.	45
3.1.1 Animais e coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo.....	45
3.1.2 Preparação de extratos de proteínas de espermatozoides	46
3.1.3 MudPIT.....	46
3.1.4 Espectrometria de massa	47
3.1.5 Análise de bioinformática.....	48
3.2 Experimento 2 – Regulação hormonal da expressão de β-defensinas no epidídimo de suínos imunizados contra o GnRH	48
3.2.1 Obtenção das amostras de tecido epididimário e grupos experimentais	48

3.2.2 Extração de RNA tecidual e síntese de DNA complementar	49
3.2.3 qPCR.....	49
3.2.4 Análise estatística	51
3.3 Considerações éticas	51
4. RESULTADOS	52
4.1 Proteínas identificadas no espermatozoide da cauda do epidídimo por MudPIT	52
4.2 Regulação hormonal da expressão de β-defensinas no cachaço.....	58
5. DISCUSSÃO	61
5.1 Proteômica do espermatozoide suíno.....	61
5.2 Regulação androgênica da expressão de β-defensinas em testículo e epidídimo de suínos.	73
6. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma das atividades mais importantes no cenário do agronegócio brasileiro. O setor vem expandindo com o passar dos anos, fato este corroborado pelo crescimento do número de suínos abatidos, que em 2011 era de 8,62 milhões de suínos por trimestre, chegando a 10,46 milhões no 2^a trimestre de 2016, apesar do país encontrar-se em um estado de recessão econômica (BRASIL, 2016).

A região Sul possui o predomínio na suinocultura, tendo Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, respectivamente, abates de 2,7 milhões, 2,08 milhões e 2,04 milhões de cabeças segundo trimestre de 2016, representando assim cerca de 65% do montante de abates do país. Além disso o setor continua em expansão, considerando o aumento da taxa de abate de 7,5%, 7,1% e 4,5% do 2^o trimestre de 2015 para o segundo trimestre de 2016, respectivamente para os estados anteriormente citados. Neste mesmo período houve aumento de 8,0% no total de abates no Brasil. Além do aumento no número de animais abatidos houve aumento do volume de exportações *in natura* e do faturamento se comparado ao trimestre anterior (BRASIL, 2016). No Vale do Taquari a suinocultura figura como uma das mais importantes cadeias do agronegócio sendo responsável pela geração de renda e pela manutenção da população rural no campo. Do ponto de vista industrial, em 2015, duas empresas com típica atuação no Vale do Taquari apresentavam-se entre as 12 maiores exportadoras de carne suína do Brasil (ABPA, 2016).

A cadeia produtiva da suinocultura está cada vez mais tecnificada, com grande potencial de crescimento para pequenos, médios e grandes produtores. Dentre os fatores que mais impactam na produtividade do rebanho encontra-se a reprodução, que através de diminuição do número e do peso de leitões nascidos, aumento das taxas de retorno ao cio e aumento dos dias não produtivos, acarreta em perda de produção e produtividade,

podendo inclusive comprometer o aspecto financeiro da atividade (ABCS, 2014). Neste sentido a utilização das biotecnologias disponíveis, deve ser criteriosamente estudada caso a caso, a fim de que se possa obter o melhor desempenho para a atividade (KNOX, 2016).

A utilização da inseminação artificial (IA) em suínos é quase unanimidade nos empreendimentos tecnificados (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007). Através da IA consegue-se imprimir uma maior pressão de seleção genética, contribuindo assim para a formação de linhagens consolidadas. Neste aspecto a fertilidade dos machos é fator crítico, visto que além do potencial genético, o mesmo deve ter boa capacidade de transmissão.

O processo reprodutivo masculino envolve uma série de processos, desde a espermatogênese até a ejaculação. Durante a passagem pelo epidídimo, ducto longo e enovelado, o espermatozoide é submetido ao processo de maturação epididimária, no qual adquire a motilidade progressiva e a capacidade fecundante (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980). O epidídimo, através de suas células epiteliais, contribui juntamente com o fluido testicular e com o fluido decorrente do metabolismo espermático, com a secreção e a absorção de substâncias luminais, que irão formar o fluido epididimário. Diversas proteínas são secretadas e absorvidas durante o transito epididimário, apresentando perfis de secreção e absorção particulares nas porções epididimárias (DACHEUX *et al.*, 2005), como as β -defensinas, que possuem, de modo geral, uma maior expressão na porção do corpo do epidídimo (BELLEANNEE *et al.*, 2012).

Durante a maturação epididimária ocorrem alterações na composição proteica do espermatozoide. Na cauda do epidídimo são estocados temporariamente os espermatozoides aptos a fertilização, após a maturação. O conhecimento da composição proteica deste espermatozoide permite a identificação e o isolamento das condições responsáveis pela maturação epididimária. Metodologias de sequenciamento de última geração com alto poder de separação peptídica, como o MudPIT, permitem uma acurada varredura e identificação das proteínas existentes, fornecendo dados das pesquisas básicas, para pesquisas envolvendo bioinformática e ampliando os horizontes das pesquisas aplicadas (LI *et al.*, 2016).

Sabe-se que após a coleta e processamento do sêmen, fatores como contaminação microbiana, falhas na refrigeração e aplicação inadequada podem afetar os índices reprodutivos, contribuindo para a perda da produtividade do plantel (KNOX, 2016). Via de regra são adicionados antibióticos aos diluentes de sêmen, que além do risco de causarem efeitos deletérios a célula espermática, podem culminar em resistência microbiana (HAFEZ e HAFEZ, 2004). O organismo animal dispõe de mecanismos fisiológicos para a manutenção de um status sanitário adequado, mesmo em tecidos altamente especializados e segregados da imunidade, como o testículo e o epidídimo (CHENG e MRUK, 2012; FRANCA *et al.*, 2012; GREGORY e CYR, 2014).

As β -defensinas, que possuem uma coabitação evolutiva principalmente com os tecidos epiteliais (ZHU e GAO, 2013), participam dos mecanismos de defesa imune, combatendo microrganismos invasores e auxiliando no desenvolvimento de resposta imune adaptativa (YANG *et al.*, 1999). Além destas funções as β -defensinas atuam em outras frentes, como na quimiotaxia, na modulação da resposta imune, na cicatrização tecidual e na reprodução (YANG *et al.*, 2002; SEMPLE e DORIN, 2012). As β -defensinas também possuem relação com a reprodução, como a β -defensina 126 em primatas, que auxilia no imunoreconhecimento (YUDIN *et al.*, 2005), na penetração do muco cervical (TOLLNER *et al.*, 2008b) e na interação com o oócito (TOLLNER *et al.*, 2008a), a β -defensina bin1b, que auxilia na maturação espermática (ZHOU *et al.*, 2004) e a β -defensina 15, importante para a motilidade e fertilidade em ratos (ZHAO *et al.*, 2011), dentre outras.

As diferentes metodologias de pesquisa vinculadas a reprodução animal, nos âmbitos genômico, proteômico e metabolômico, são importantes para a modernização e o desenvolvimento de biotecnologias a serem utilizadas em nível de campo. Técnicas já consagradas como a inseminação artificial podem ser otimizadas mediante alterações em pontos críticos, como a adição de proteínas como as β -defensinas nas doses inseminantes, buscando-se uma diminuição mais gradual nos parâmetros espermáticos e garantindo uma maior vida útil. Além disso, através de estudos envolvendo clonagem e expressão em vetores pode-se otimizar a produção de compostos necessários para a maior conservação, conferindo assim uma alçada biotecnológica a pesquisa.

De modo geral, o estudo da maturação epididimária e as proteínas envolvidas nesta fase, como as β -defensinas, auxiliam no entendimento da dinâmica da maturação

epididimária. O estudo da composição proteica do espermatozoide retirado da cauda do epidídimo possui uma metodologia de pesquisa básica, identificando possíveis moléculas relacionadas com a maturação espermática, enquanto a pesquisa das β -defensinas se enquadra em uma pesquisa aplicada, na qual são testadas condições experimentais com o intuito de descrever a expressão em diferentes condições.

1.1 Objetivos

Objetivo geral

A presente dissertação tem como objetivo investigar a maturação epididimária através da (i) identificação de proteínas presentes no espermatozoide da cauda do epidídimo através da técnica MudPIT e (ii) verificação da regulação endócrina da expressão de β -defensinas no epidídimo.

Objetivos Específicos

- Extrair, identificar e quantificar as proteínas de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo.
- Realizar análises de bioinformática a partir dos dados de proteômica.
- Quantificar através da qPCR a expressão de β -defensinas em testículo e 3 porções de epidídimo de suínos imunizados contra o GnRH.

1.2 Justificativa

O estudo do epidídimo e das proteínas presentes e expressas neste órgão auxilia na compreensão dos mecanismos de maturação espermática. Estudos em níveis proteômicos com metodologias sensíveis a modificações pós traducionais como a identificação das proteínas espermáticas servem como base para a realização de pesquisas aplicadas, que visam identificar situações específicas para as condições. Estudos em nível genômico, embora com menor relevância biológica do que estudos proteômicos e metabolômicos devido ao dogma biológico, comparam situações específicas, obtendo-se respostas para questões biológicas, como é o caso do experimento das β -defensinas.

A descoberta da proteômica de espermatozoides da cauda do epidídimo, através de metodologia de alta sensibilidade, como o MudPIT, com potencial para verificar modificações pós traducionais, fornece dados que além da composição proteica, estabelecem rotas metabólicas, funções biológicas, processos celulares e mecanismos de

interação do espermatozoide. Esta metodologia de pesquisa descritiva permite a identificação de biomoléculas com importante função biológica, podendo ser posteriormente estudadas em separado em condições experimentais.

O estudo da expressão das β -defensinas em animais imunizados contra o GnRH, modelo animal de hipogonadismo, é importante para que se estabeleça a relação entre a depleção androgênica e a expressão epididimária destas proteínas. Os estudos genômicos podem permitir a seleção de reprodutores com melhores características espermáticas e seminais, através da utilização de biomarcadores.

Através destes dados também pode-se inferir acerca de biotecnologias reprodutivas que venham a utilizar as β -defensinas como componentes das doses de sêmen, no intuito de, por exemplo, aumentar a vida útil das mesmas ou suprir determinadas carências específicas (JOHNSON *et al.*, 2000). Os dados obtidos nesta pesquisa podem ser extrapolados para a medicina humana, em casos de hipogonadismo, condição semelhante a depleção androgênica do modelo animal suíno (WERNERSSON *et al.*, 2005; BIANCO e KAISER, 2009).

Além dos fatos acima expostos, os estudos em maturação espermática em suínos são importantes para a suinocultura brasileira, responsável em grande parte pelo PIB nacional e pelas exportações. A região Sul, devido a sua representatividade de 65% dos animais abatidos no país, também pode ser impulsionada por biotecnologias reprodutivas que venham a ser desenvolvidas (BRASIL, 2016). A região do Vale do Taquari apresenta a suinocultura como uma das mais importantes cadeias do agronegócio (ACSURS., 2015), com 2 empresas com marcada atuação regional entre as 12 maiores exportadoras de carne suína em 2015 (ABPA, 2016), podendo assim serem aplicados os conhecimentos a nível de campo, promovendo o desenvolvimento regional, missão desta Instituição de ensino (UNIVATES, 2015).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente seção tem por objetivo descrever os achados de literatura relacionados as proteômica espermática, se tratando do experimento I, intitulado “Proteômica do espermatozoide da cauda do epidídimo de suínos por MudPIT”. Posterior a estes dados serão apresentados os dados referente a β -defensinas e a maturação epididimária em suínos, se tratando do experimento 2, intitulado de “Regulação androgênica de β -defensinas em testículo e epidídimo de suínos”.

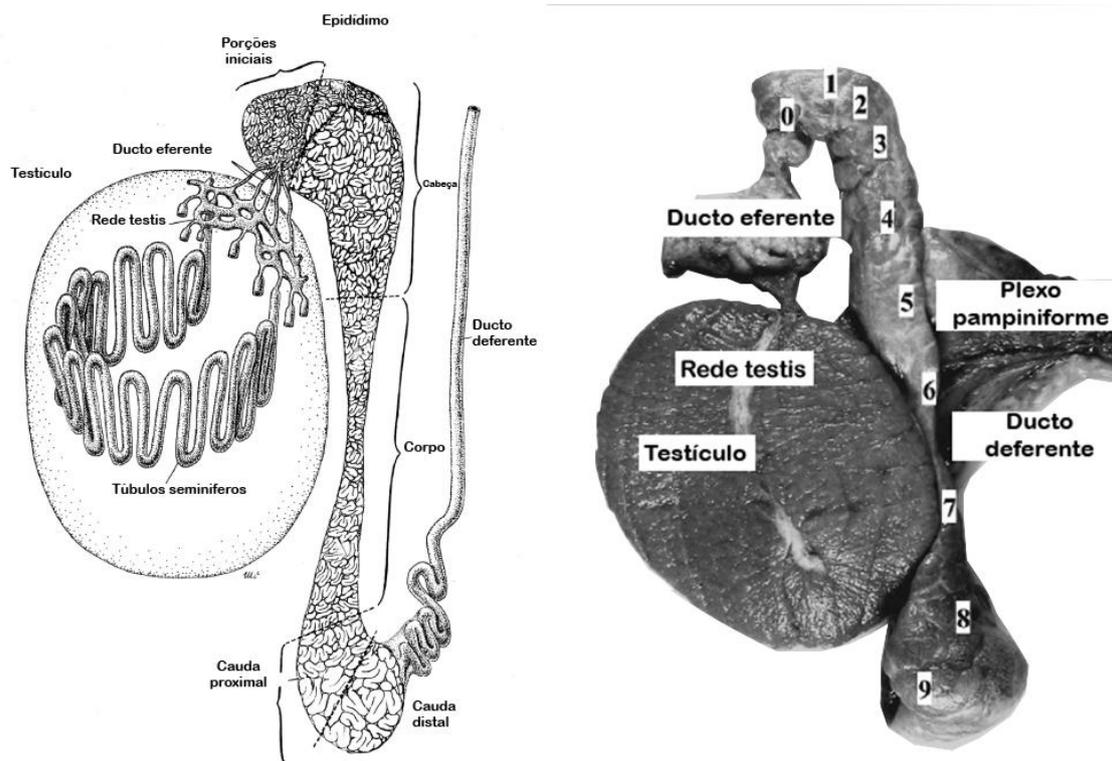
2.1 O Epidídimo

O epidídimo é um ducto enovelado que conecta os ductos eferentes aos ductos deferentes, possuindo funções essenciais para a viabilidade espermática. O espermatozoide ao sair do testículo é imóvel e não possui capacidade de fecundar o oócito, sendo que após a passagem pelo epidídimo o mesmo adquire motilidade progressiva e passa a ser capaz de fecundar o oócito (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980; ROBAIRE e HINTON, 2015)

2.1.1 Anatomia Epididimária

O conhecimento da anatomia epididimária é necessário para a compreensão dos mecanismos fisiológicos que ocorrem neste tecido. O epidídimo é o canal pelo qual os espermatozoides, ainda não capacitados, passam e adquirem características essenciais para a sua atividade. A figura 1 demonstra a relação do testículo com o epidídimo e as suas regiões macroscópicas: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (ROBAIRE e HINTON, 2015).

Figura 1- Representação esquemática e anatômica do testículo e do epidídimo de suínos.



Fonte: Modificado de Robaire e Hinton (2015) e de Dacheux et al (2005)

A fins de estudos mais aprimorados o epidídimo é geralmente dividido em dez porções, denominadas de 0 a 9 (figura 1). A cabeça do epidídimo é subdividida em 3 porções: 0 e 1 são citadas como proximal, as regiões 2 e 3 como porção central e a região 4 como distal. O corpo do epidídimo está representado de 5 a 7, sendo 5 a região proximal, 6 a central e 7 a distal. A cauda do epidídimo é representado em duas porções, sendo a 8 proximal e a 9 distal (DACHEUX *et al.*, 2005). O comprimento do epidídimo varia de acordo com a espécie, podendo ser de 3 metros em ratos, 3 a 6 metros em homens, 54 metros em suínos e 80 metros em equinos (ROBAIRE e HINTON, 2015). Durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo o mesmo vai sendo exposto a diferentes tipos celulares, diferentes secreções e diferentes meios, o que propicia a sua maturação pós-testicular (DACHEUX *et al.*, 2005)

Macroscopicamente o ducto epididimário torna-se mais espesso da cabeça ao corpo do epidídimo. O epidídimo possui uma barreira sanguínea (ARRIGHI, 2014), que confere características especiais a esta região, além de proteger os espermatozoides do organismo e auxiliar na regulação e preservação do epidídimo, visto que o

espermatozoide é considerado como um corpo estranho ao organismo (DACHEUX *et al.*, 2005).

O tecido epididimário possui algumas peculiaridades que lhe conferem características próprias, tanto em se tratando das células presentes no epitélio, quanto do conteúdo luminal. As células epiteliais epididimárias, bem como as células de Sertoli testiculares, formam uma barreira sanguínea, provendo assim permeabilidade seletiva local. Esta diferenciação além de anatômica é fisiológica, devido a modificações celulares e nos seus mecanismos de sinalização e transporte celular, bem como imunológica, devido a alterações nos padrões de resposta a estímulos (HINTON, 2000; MITAL *et al.*, 2011; CHENG e MRUK, 2012; GREGORY e CYR, 2014).

Histologicamente as alterações descritas no epidídimo variam de acordo com a região. O epitélio é mais espesso na porção inicial e vai se tornando mais fino até chegar a cauda, enquanto a espessura da camada muscular e o diâmetro luminal aumentam da cabeça para a cauda. O formato luminal também varia, sendo oval nas porções iniciais e estrelado na porção caudal (DACHEUX *et al.*, 2005).

Vários são os tipos celulares que compõem o epidídimo: células principais, células estreitas, células apicais, células claras, células basais, células de halo e células dendríticas. Estes tipos celulares são responsáveis por funções de secreção e absorção epididimária, pela manutenção do ambiente luminal e, conseqüentemente, pela maturação epididimária. Os tipos celulares são encontrados em todas as porções do epidídimo podendo apresentar diferenças nas suas atividades, dependendo do local (ARRIGHI, 2014; ROBAIRE e HINTON, 2015).

As células principais estão presentes ao decorrer de todo ducto, porém apresentam diferenças estruturais dependendo da porção, como as gotículas de gordura, que somente foram descritas no corpo do epidídimo. Este grupo celular apresenta um complexo altamente desenvolvido de secreção e de atividade endocítica (ROBAIRE e HINTON, 2002). A secreção ocorre através do retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e grânulos secretórios, enquanto a atividade endocítica possui sítios de depressão celular, endossomas, corpos multivesiculares e lisossomas (ROBAIRE e HINTON, 2015). A secreção de epididimosomas, que são proteínas envolvidas na capacitação espermática,

ocorre nas células principais, de modo apócrino, demonstrando a especificidade deste grupo celular (SULLIVAN e SAEZ, 2013).

O grupo de células apicais é encontrado principalmente nos segmentos inicial e intermediários e não possui atividade conhecida. As células estreitas atuam na endocitose e na secreção de íons H^+ para o lúmen, auxiliando na acidificação do meio luminal. As células claras auxiliam na retirada das gotas citoplasmáticas durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo, bem como auxiliam as células estreitas na acidificação do meio luminal. As células basais atuam na proteção do ducto, na formação da membrana sanguínea e realizam trocas com as células principais, mediando fenômenos de regulação eletrolítica e transporte de água, aquaporinas e prostaglandinas, além de estarem envolvidas em processos de degeneração testicular em animais com marcada sazonalidade reprodutiva (ARRIGHI, 2014). As células de halo são responsáveis pela defesa local, consistindo de linfócitos T auxiliares, citotóxicos e monócitos. As células dendríticas são apresentadores de antígenos que intermediam as relações das células de halo com o sistema linfático (ROBAIRE e HINTON, 2015).

Neste contexto, a expressão epididimária de β -defensinas, proteínas relacionadas com a imunidade inata e com alterações espermáticas, se fundamenta e surge como alternativa biotecnológica em casos de infertilidade e para obtenção de melhores resultados reprodutivos (ZHOU *et al.*, 2004; NARCIANDI *et al.*, 2014).

2.1.2 Fisiologia Epididimária

Os estudos epididimários norteiam os processos de maturação testicular e definem a dinâmica desta atividade, utilizando-se assim de conceitos já bem implantados se tratando de fisiologia andrológica. Cabe aqui nesta seção uma breve revisão sobre o espermatozoide, ciclos espermáticos e controle endócrino da espermatogênese (HAFEZ e HAFEZ, 2004; CHENG, 2008).

O espermatozoide é o gameta masculino que, ao se unir com o gameta feminino, pode gerar um embrião. Ele é composto de duas porções principais, cabeça e cauda, que de um modo geral, são responsáveis pela manutenção da cromatina, pela fusão com a zona pelúcida e pela movimentação do espermatozoide. A formação desta célula conta

com divisões mitóticas e meióticas, que transformam uma célula primordial no gameta reprodutivo (HAFEZ e HAFEZ, 2004; HESS e FRANÇA, 2008).

O parênquima testicular é o local no qual estão locadas as células primordiais, que se originam do mesoderma embrionário (MOORE, 2008). Este tecido possui em sua constituição os tipos celulares de Leydig e de Sertoli. As células intersticiais de Leydig estão situados entre os túbulos seminíferos e secretam os hormônios masculinos de modo exócrino ou parácrino. As células de Sertoli realizam a sustentação das células germinativas e formam uma barreira sanguíneo testicular, que compartimentaliza o ambiente seminífero das defesas imunitárias devido ao caráter antigênico das células germinativas (HAFEZ e HAFEZ, 2004; HESS e FRANÇA, 2008).

O epitélio seminífero é a camada celular luminal, representado pelas células de Sertoli, que sustentam as células espermáticas primordiais. Durante as modificações espermáticas as células primordiais (espermatogônias) dividem-se inúmeras vezes até que se formem os espermatozoides, que são liberados luminalmente nos túbulos seminíferos. Estas modificações podem ser divididas em espermatocitogênese, espermiogênese e espermição, sendo que a duração de todo este processo, dependendo da espécie, pode durar de 4 a 5 ciclos de 9 a 12 dias cada (HAFEZ e HAFEZ, 2004; HESS e FRANÇA, 2008; HERMO *et al.*, 2010b).

A espermatocitogênese compreende desde a fase de espermatogônias, que se dividem através de mitose, por várias vezes, gerando células filhas diploides. Após esta primeira fase as espermatogônias se dividem novamente para formar espermatócitos primários. O espermatócito primário, com carga genética diploide sofre a primeira meiose reducional, gerando espermatócitos secundários com carga genética haploide. Após esta fase ocorre a meiose equacional que irá gerar as espermátides com carga genética haploide, encerrando a fase de espermatocitogênese (HAFEZ e HAFEZ, 2004; MOORE, 2008; HERMO *et al.*, 2010b).

A espermiogênese compreende as transformações morfológicas das espermátides que irão gerar os espermatozoides. Este período é subdividido nas fases de golgi, capuchão, acrossomo e maturação. Após o término destas fases o espermatozoide se desprende da célula de sustentação através do colo, podendo nestes casos haver a

permanência de partículas denominadas gotas citoplasmáticas proximais (HAFEZ e HAFEZ, 2004; HERMO *et al.*, 2010a).

A regulação das atividades destas células depende basicamente de um intrincado eixo hormonal que envolve o hipotálamo, a hipófise e a gônada. O hipotálamo atua liberando pulsos de GnRH para a hipófise anterior, que por sua vez libera LH e FSH. O LH estimula as células de Leydig a produzirem andrógenos, especialmente a testosterona. Estes andrógenos quando na circulação estimulam a espermatogênese e suprimem a secreção de GnRH, LH e FSH, mediante feedback negativo hipotalâmico e hipofisário. O FSH é responsável pelo estímulo das células de Sertoli para a produção de proteína ligadora de andrógeno (ABP), pela conversão de testosterona em seu análogo mais ativo (di-hidrotestosterona), pela manutenção da espermatocitogênese, pela espermição e secreção de inibina. A inibina atua a nível hipotalâmico e hipofisário inibindo a secreção de FSH (HAFEZ e HAFEZ, 2004; HERMO *et al.*, 2010b).

A maturação do espermatozoide ao passar pelo epidídimo requer alterações como aquisição de habilidade fecundante ou capacidade fecundante, aquisição de motilidade, capacidade de reconhecimento e ligação a zona pelúcida, capacidade de fusão com membrana vitelina. Durante os processos de maturação também ocorre a migração da gota citoplasmática, o remodelamento acrossomal, modificações na cromatina nuclear e em organelas e fusão de epididimossomas. Estas alterações conferem ao espermatozoide a capacidade fecundante (HERMO *et al.*, 2010c; ROBAIRE e HINTON, 2015). Sabe-se também que o espermatozoide adquire capacidade fecundante ao passar pelo epidídimo, sendo que espermatozoides retirados da cabeça do epidídimo possuem baixa capacidade fecundante, seja *in vitro* ou *in vivo*. Espermatozoides retirados do corpo do epidídimo possuem uma limitada capacidade de fecundação, sendo que a mesma somente é expressa em seus níveis mais altos quando do espermatozoide presente ou retirado da cauda do epidídimo (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980).

Algumas alterações são verificadas quando se trata da porção do epidídimo em que o espermatozoide já se encontra capacitado em diferentes espécies. Pode-se tomar como exemplo os saguis, nos quais já podem ser recuperados espermatozoides maturados nas porções iniciais do epidídimo. Os ratos, camundongos e hamsters, por sua vez, possuem espermatozoides capacitados somente nas porções finais do epidídimo. O suíno,

modelo animal desta pesquisa, encontra-se entre estas duas situações acima citadas (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980; ROBAIRE e HINTON, 2015).

As modificações que ocorrem durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo são basicamente alterações em decorrência de secreção e absorção de substâncias, que geram assim, ambientes diferentes entre si, responsáveis pela maturação nas diferentes porções epididimárias (DACHEUX *et al.*, 2005). O epitélio epididimal é, portanto, um tecido com alta diferenciação regional, sendo capaz de realizar diferentes funções de acordo com a região. O perfil de secreção e absorção das proteínas epididimárias vem sendo estudado a fim de que se possa elucidar os mecanismos e as interações que ocorrem com o fluido testicular, gerando assim espermatozoides capacitados (BELLEANNEE *et al.*, 2012).

O controle dos fenômenos de secreção, absorção e manutenção do meio epididimal requer uma perfeita harmonia entre as rotas hormonais. Os hormônios andrógenos, como a testosterona produzida pelas células testiculares de Leydig, são responsáveis pelo metabolismo, transporte de íons, síntese e secreção de proteínas epididimárias, além da maturação, transporte e armazenamento dos espermatozoides. A expressão de várias β -defensinas é considerada dependente de andrógenos (ZHAO *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2014). Após a incorporação da testosterona pelas células principais, a mesma pode divergir para duas rotas: a formação de di-hidrotestosterona (composto com maior atividade biológica), através da enzima 5 alfa redutase, ou a formação de estradiol, através da enzima aromatase p450. Ambas rotas metabólicas são descritas como reguladoras da expressão gênica, e conseqüentemente, reguladoras do metabolismo epididimário (BELLEANNEE *et al.*, 2012).

Em humanos o controle da expressão epididimária foi estudado em três porções, elucidando assim o controle através dos hormônios, da secreção luminal provinda do testículo, da temperatura e dos micros RNAs (BELLEANNEE *et al.*, 2012). Cabe salientar que o controle destas condições não é gerado através de um único mecanismo, mas sim de uma interação entre os mesmos. Do ponto de vista hormonal, tanto andrógenos como estrógenos apresentam efeitos de modulação epididimária, sendo que os efeitos estrogênicos vem sendo estudados e estão ganhando notoriedade neste aspecto (JOSEPH *et al.*, 2011).

Em estudo realizado com ratos, verificou-se que a expressão de β -defensinas varia em relação ao sítio tecidual epididimário. Isto pode ser verificado em decorrência da divisão do trato epididimário de ratos em 19 porções e a realização de ensaios de expressão gênica, que demonstraram uma grande variação entre as regiões estudadas (JELINSKY *et al.*, 2007). Estes dados corroboram dados já obtidos em outras espécies, demonstrando expressão epididimária diferenciada (HALL *et al.*, 2007; BELLEANNEE *et al.*, 2012).

A concentração espermática, bem como outros fatores, são afetados durante o trajeto pelo epidídimo, variando de 10^3 nos ductos eferentes, 10^4 na rede testis, para 10^9 na cabeça do epidídimo. O percentual de espermatozoides com defeitos, sejam eles maiores ou menores, diminui através da passagem pelo epidídimo (ROBAIRE e HINTON, 2015). O metabolismo energético ocorre com maior intensidade no corpo do epidídimo, visualizado através de uma produção local de CO_2 e de uma maior conversão de glicose em lipídeos. Na porção final do epidídimo ocorre uma diminuição neste metabolismo (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980).

2.2 Proteômica espermática

O complexo e extenso processo de diferenciação celular que transforma uma espermátide, célula imatura, no espermatozoide, célula altamente especializada, inicia no testículo, mas somente está completa após a maturação epididimária (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980). O epidídimo é um tubo longo, que recebe os espermatozoides e o fluido testicular oriundos da rede testis, através dos ductos eferentes. Este órgão é subdividido em várias porções, variando entre as espécies. A fim de melhor compreensão pode-se dividir o epidídimo em 3 porções principais, compostos por cabeça, corpo e cauda, sendo que cada porção possui um perfil metabólico.

Durante o trânsito epididimário, o espermatozoide sofre uma série de alterações que irão determinar a sua natureza proteica quando maturado. Estas alterações removem ou transformam muitas das proteínas espermáticas superficiais, além de adicionar proteínas importantes para a função espermática (COWAN e MYLES, 1993; DACHEUX *et al.*, 2005). No final do transito e da maturação epididimária, os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo, encontrando-se aptos para serem ejaculados e

posteriormente fecundar o oócito (PENA *et al.*, 2015). As alterações pós traducionais sofridas pelo espermatozoide, como a fosforilação e glicosilação, podem alterar a composição proteica espermática, sendo necessário assim que as metodologias utilizadas para análise proteômica incluam modificações pós traducionais, como é o caso do MudPIT (BAKER, 2016).

Estudos anteriores demonstraram a complexidade do proteoma espermático e das relações proteicas na fisiologia seminal e reprodutiva. Baker e colaboradores identificaram 1397 proteínas em espermatozoides humanos ejaculados (BAKER *et al.*, 2007), 3044 proteínas em espermatozoide de ratos (BAKER *et al.*, 2008), contudo este número foi expandido para 4675 proteínas em humanos, das quais 227 são específicas do testículo, contribuindo assim para o conhecimento da biologia espermática (WANG *et al.*, 2013). Estudos de proteômica comparativa identificam em escala global proteínas, sendo posteriormente submetidos a análises de bancos de dados que identificam possíveis biomarcadores. Através do uso da metodologia iTRAQ e espectrometria de massas com cromatografia líquida, o grupo de Sullivan descreu 33 proteínas diferencialmente expressas em homens férteis, homens com problemas de infertilidade e homens com histórico de falhas em fertilização *in vitro*. Destas proteínas, 4 foram comuns aos grupos de homens com fertilidade reduzida, sendo elas: semenogelin, prolactin induced protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase 2 (LEGARE *et al.*, 2014).

Através da utilização de eletroforese 2D, o proteoma de espermatozoide suíno e da secreção epididimária foi estudado por diferentes grupos de pesquisa, evidenciando a relação e a importância de diversas proteínas na maturação epididimária (SYNTIN *et al.*, 1996; BELLEANNEE *et al.*, 2011; KWON *et al.*, 2015). Atualmente, através das técnicas proteômicas shotgun é possível expandir o conhecimento da composição proteica espermática através de metodologias que utilizam espectrometria de massas aliada a processos de separação e identificação de alta resolução.

O espermatozoide é uma das células com maior compactação nuclear e citoplasmática, visto que necessita carrear a informação genética e percorrer os tratos reprodutivos masculino e feminino em direção ao oviduto, local de fecundação. Para que estas atividades possam ser adequadamente realizadas o espermatozoide apresenta um proteoma vasto, com muitas proteínas sendo expressas. Proteínas relacionadas com o

metabolismo oxidativo, como a superóxido dismutase e glutatona estão presentes nas células espermáticas (PARK *et al.*, 2012), bem como proteínas relacionadas com a maturação epididimária, como fosfoproteínas e proteínas chaperona (DACHEUX *et al.*, 2012; SCHORR-LENZ *et al.*, 2016). Além destas, as β -defensinas, proteínas relacionadas com a imunidade inata e com os tecidos reprodutivos, possuem expressão epididimária (GANZ, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2012).

2.3 β -Defensinas

2.3.1 Peptídeos antimicrobianos

Os organismos dos reinos vegetal e animal produzem uma vasta quantidade de moléculas antimicrobianas, cuja função é neutralizar e combater organismos invasores. Um dos modos de ação dos peptídeos antimicrobianos está relacionado com a ruptura das membranas celulares ricas em fosfolipídios (GANZ, 1999). Além disso, a produção de energia é afetada e o bloqueio nas vias da formação da membrana celular levam a formação de poros na membrana celular (HALL *et al.*, 2007; SASS *et al.*, 2008). Estes compostos possuem outros mecanismos de ação que não a formação de poros e de rompimento das membranas celulares, podendo interagir com a síntese de DNA e RNA, com a síntese proteica (MARDIROSSIAN *et al.*, 2014), com os mecanismos pós traducionais de empacotamento e dobramento proteico e com a integridade da membrana celular (HALE e HANCOCK, 2007).

A coabitação evolutiva dos peptídeos antimicrobianos com os microrganismos permite uma ação seletiva destes compostos sobre os microrganismos patogênicos, mantendo a flora normal e contribuindo para a resolução do foco de infecção, ao contrário de compostos químicos, que geralmente atuam sobre a maioria das formas microbianas (PASUPULETI *et al.*, 2012). Estas características tornam os peptídeos antimicrobianos importantes ferramentas biotecnológicas, em áreas biomédicas (YEUNG *et al.*, 2011), no combate ao câncer, à diabetes e infecções virais (CONLON *et al.*, 2014), na oftalmologia (SILVA *et al.*, 2013), no combate a microrganismos (SHI *et al.*, 1999; ZASLOFF, 2002; SANG e BLECHA, 2008; VELDHUIZEN *et al.*, 2008; LAVERTY *et al.*, 2011; FJELL *et al.*, 2012; MATARACI e DOSLER, 2012; TAVARES *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2015), na regulação da resposta imune (YANG *et al.*, 2002; PASUPULETI *et al.*, 2012) e no

provimento de sanidade animal (MEADE *et al.*, 2014). Cabe neste tópico citar que o uso de peptídeos antimicrobianos ainda necessita de estudos para que se aprimore a sua utilização. Não obstante, já existem relatos de resistência de bactérias Gram negativas (ELAHI *et al.*, 2006; GRUENHEID e LE MOUAL, 2012; TZENG e STEPHENS, 2015) e Gram positivas (JOO e OTTO, 2015) a estes peptídeos.

Dentre os peptídeos antimicrobianos, encontramos as catelicidinas e as defensinas (BOMAN, 1995; GANZ, 1999; HALL *et al.*, 2002; TIZARD, 2014). As catelicidinas são peptídeos antimicrobianos já descritos nas medicina humana e veterinária, encontrados em células mononucleares sanguíneas, possuindo grandes variações estruturais e moleculares, diferenciando-se das defensinas por não possuir ligações dissulfídicas entre cisteínas (BOMAN, 2003). As moléculas de defensinas são pequenos polipeptídios catiônicos contendo geralmente menos de 100 aminoácidos, cuja ação se baseia em modificações na estrutura ou função das membranas celulares. (GANZ, 1999). A β -defensina humana 3, por exemplo, atua contra *Staphylococcus aureus* causando a morte rápida da bactéria e bloqueando as vias biossintéticas (SASS *et al.*, 2008).

As defensinas são peptídeos antimicrobianos que possuem importante função na imunidade inata do organismo atuando em uma ampla gama de microrganismos, como bactérias, fungos e alguns vírus envelopados (BOMAN, 1995; GANZ, 1999; HALL *et al.*, 2002; HALL *et al.*, 2007). Elas são umas das primeiras mediadoras da imunidade inata em insetos, plantas e animais, possuindo assim ação antimicrobiana e imunomodulatória (OPPENHEIM *et al.*, 2003; TIZARD, 2014; ZHAO e LU, 2014). A relação imunitária se deve a condição de que as defensinas atuam na transição da imunidade inata com a imunidade adquirida, devido a quimiotaxia exercida, atraindo células dendríticas imaturas e linfócitos T (YANG *et al.*, 1999), bem como em mecanismos de apoptose e na modulação da resposta imune adquirida (NAGAOKA *et al.*, 2012).

A expressão das defensinas pode ser constitutiva ou induzida. A expressão das defensinas em resposta a infecção por *Mycobacterium paratuberculosis* e por *Pasteurella haemolitica* demonstram haver expressão local induzida pela infecção no trato digestivo e pela inoculação no trato respiratório, respectivamente. Ainda nesta pesquisa, sugere-se que a expressão e a atividade das defensinas pode ocorrer independentemente dos outros mecanismos de defesa do sistema imune (STOLZENBERG *et al.*, 1997).

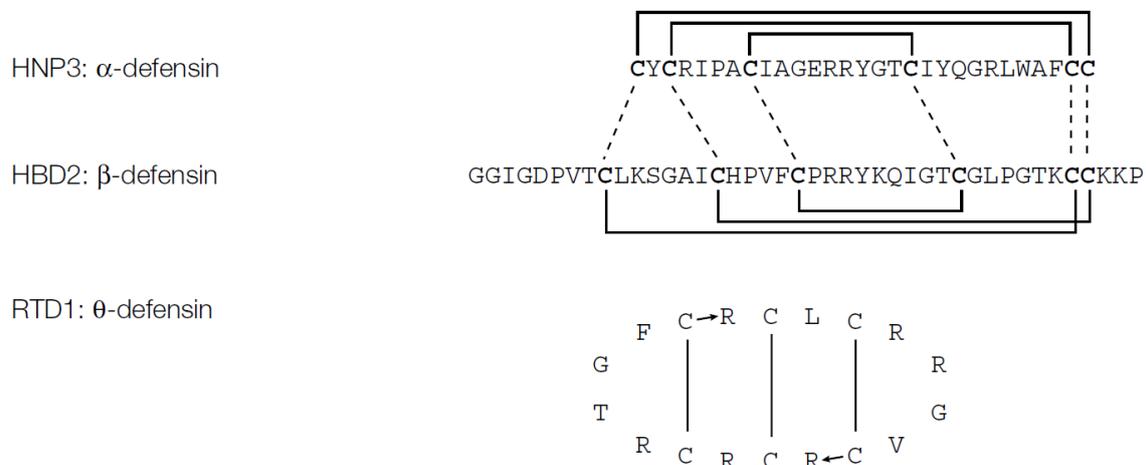
A expressão constitutiva de defensinas é importante para a manutenção de um status antimicrobiano local, favorecendo o controle antimicrobiano. A expressão e a interação das defensinas constitutivas e indutivas é complexa, visto que uma defensina pode ser expressa constitutivamente em um sítio e expressa de forma induzida em outro, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente (KAISER e DIAMOND, 2000) ou de mecanismos necessários a maturação epididimária (JELINSKY *et al.*, 2007).

2.3.2 Classificação

As defensinas são classificadas em três grupos de acordo com diferenças estruturais. As α e β -defensinas são caracterizadas por folhas beta pregueadas e pela presença de pontes dissulfídicas entre 6 cisteínas, enquanto as teta defensinas possuem estrutura circular (GANZ, 2003). A variação entre α e β -defensinas é resultado das diferenças entre o tamanho dos segmentos entre as cisteínas e ao pareamento entre as cisteínas devido as pontes sulfídicas. As α -defensinas possuem segmentos menores entre as cisteínas se comparado as β -defensinas (JARCZAK *et al.*, 2013).

As ligações encontradas entre as cisteínas são 1-6, 2-4 e 3-5 nas α -defensinas, enquanto nas β -defensinas estas ligações são 1-5, 2-4 e 3-6 (BOMAN, 1995). Nas teta defensinas as ligações são 1-6, 2-5 e 3-4, conforme figura 2 (TANG *et al.*, 1999; GANZ, 2003). A identificação de β -defensinas geralmente se baseia em sítios próximos as cisteínas, devido a manutenção de caracteres genômicos típicos nestes locais (PATIL *et al.*, 2005; SANG *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2012).

Figura 2 - Pontes de ligação entre as cisteínas presentes em HNP3 (α -defensina), HBD2 (β -defensina) e RTD1 (θ -defensina).



Fonte: adaptado de Ganz (2003)

A distribuição das defensinas varia em decorrência da espécie e dos tecidos. Pode-se tomar como exemplo as α -defensinas que podem ser encontradas em granulócitos e nas células de Paneth, sendo responsáveis por cerca de 15% da proteína total neste primeiro grupo celular. As β -defensinas, por sua vez, são expressas pelas células epiteliais que revestem as vias aéreas, os sistemas genito-urinário e tegumentar e as glândulas salivares, enquanto as θ -defensinas são encontradas em células leucocitárias de primatas (TANG *et al.*, 1999; GANZ, 2003).

A predileção da localização e a maior concentração das defensinas em alguns sítios corporais se deve ao fato de que nestes locais há maior probabilidade de invasão microbiana e maior metabolismo luminal, aumentando o desafio local (TIZARD, 2014). Algumas populações de β -defensinas já foram estudadas no trato reprodutivo, tanto do macho (HALL *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2011) quanto da fêmea (CHEN *et al.*, 2010), sendo que a manutenção de clusters, tanto na mesma espécie, quanto em espécies diferentes, facilita a identificação (PATIL *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2012). As α -defensinas ainda não foram descritas em suínos, bem como as θ -defensinas, sendo assim o estudo voltado para a expressão de β -defensinas (SANG *et al.*, 2006; JARCZAK *et al.*, 2013).

2.3.3 β -defensinas

As β -defensinas são sintetizadas como precursores, sofrendo alterações posteriores, que irão determinar a conformação proteica. O precursor das β -defensinas consiste de uma sequência sinal, uma região pré-sequencial e subsequentemente a defensina madura (GANZ, 2003). A β -defensina suína 1 possui 2 regiões exônicas curtas, 82 e 234 pares de bases respectivamente, apresentando entre elas uma região intrônica de 1535 pares de bases. A porção transcrita possui 316 pares de bases, sendo que a região corresponde ao RNA a ser traduzido corresponde a 114 pares de bases (ZHANG *et al.*, 1999).

A maioria das β -defensinas é composta por dois éxons, no entanto, algumas apresentam modificações evolutivas, a divisão do éxon 2 e a consequente formação de uma β -defensina com 3 éxons (SEMPLE *et al.*, 2003; CHOI *et al.*, 2012). A manutenção de clusters entre as β -defensinas permite identificar e classificar, através de estudos de bioinformática, novas proteínas (PATIL *et al.*, 2005; SANG *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2012).

A β -defensina suína 1 foi inicialmente descrita em 1998 (ZHANG *et al.*, 1998), sendo detectados altos níveis de RNA mensageiro no epitélio lingual, embora as β -defensinas bovinas já haviam sido descritas em 1993 (SELSTED *et al.*, 1993). Além disso, em análises pela RT-PCR detectou-se a expressão desta proteína em vários tecidos suínos, virtualmente todos: timo, baço, linfonodos, cérebro, fígado, rim, vesícula urinária, testículo, pele, coração, músculo, medula óssea, macrófagos alveolares, neutrófilos periféricos e cordão umbilical, com exceção das células mononucleares do sistema sanguíneo periférico nas quais não houve expressão de β -defensina, demonstrando assim a sua importância nos mecanismos de defesa do hospedeiro (ZHANG *et al.*, 1998).

O estudo da expressão de β -defensinas em suínos foi ampliado em 2006, através da utilização de bioinformática, descrevendo 11 novas β -defensinas (2, 3, 4, 104, 108, 114, 123, 125, 129, proteína epididimária 2C [pEP2C], pEP2E). O perfil de expressão destes peptídeos é variável quanto aos sítios, expressos nas vias aéreas, na mucosa oral, no fígado, intestino, pulmão, medula óssea, tecido linfóide, epidídimo, testículo, baço, timo e pele (SANG *et al.*, 2006).

Através de estudos utilizando bioinformática e homologia de sequências entre humanos, bovinos e suínos, descobriu-se em 2012, 17 β -defensinas que ainda não haviam sido reportadas em suínos, através da conservação de clusters em seu material genético, em regiões altamente conservadas próximas as ligações das cisteínas. Além disso, estudos mais aprimorados de conservação genética relataram maior identidade entre grupos de β -defensinas suínas já descritas com grupos de β -defensinas humanas, gerando assim divergência na nomenclatura utilizada. É exemplo disto a β -defensina suína 1, que apresenta maior identidade com a β -defensina 4 humana, porém, por motivos de nomenclatura, manteve-se a inicial (CHOI *et al.*, 2012).

A avaliação da expressão da β -defensina suína 115 em suínos de diferentes idades, demonstrou diferença no perfil de expressão gênica. Em rim de suínos de 2 semanas a expressão era menor do que em rim suínos de 5 meses, demonstrando que a maturação do trato urinário pode contribuir para a expressão desta β -defensina. Contudo a expressão em testículo ocorreu apenas em suínos de 2 semanas, enquanto que em suínos de 5 meses, não houve expressão. Esta alteração pode estar atrelada ao processo de maturação testicular, reforçando que a expressão das β -defensinas varie em decorrência do organismo, do tecido e da condição fisiopatológica (CHOI *et al.*, 2012). As defensinas participam, além da imunidade, em processos relacionados a capacitação espermática, ligação a zona pelúcida, influxo de cálcio e reação do acrossomo. Esta função reprodutiva das defensinas norteia os estudos em se tratando de maturação epididimária, visto que ao decorrer do epidídimo, várias defensinas são secretadas e absorvidas, auxiliando assim na capacitação espermática (TOLLNER *et al.*, 2012; COLLEDGE, 2013).

A expressão de β -defensinas em epidídimo de ratos demonstra que os fenômenos de maturação espermática podem ser dependentes destas proteínas. A β -defensina Bin1b, que possui atividade antimicrobiana e é expressa predominantemente na cabeça do epidídimo, foi citada como ligante da cabeça do espermatozoide durante o trajeto pelo epidídimo, promovendo variados padrões de ligação e interação e induzindo a motilidade progressiva em espermatozoides imóveis através de interações com o cálcio (ZHOU *et al.*, 2004). A defensina Bin1b promove aumento da resistência epididimária a infecções (FEI *et al.*, 2012), bem como sua supressão provoca uma diminuição na motilidade espermática e nos movimentos progressivos (ZHOU *et al.*, 2004). A β -defensina 15 de ratos, por sua vez, é necessária para a motilidade espermática e para a fertilidade

masculina. Esta proteína é andrógeno dependente, portanto a sua expressão varia em detrimento da supressão androgênica (ZHAO *et al.*, 2011), metodologia empregada neste projeto de pesquisa.

A deleção de um cluster relacionado a 9 defensinas em camundongos (β -defensinas 1, 2, 9, 10, 11, 13, 15, 35 e 50), gerou um fenótipo de esterilidade. Interessantemente não houve alteração na espermatogênese, fato este comprovado pela ausência de alterações visualizados na histologia a nível de testículo e epidídimo. As alterações incluem a perda da motilidade progressiva, o aumento do número de cabeças com defeitos, o aumento nos percentuais de reação espontânea do acrossoma, o aumento dos espermatozoides capacitados na hora zero e a diminuição dos espermatozoides capacitados a 90 minutos, o aumento da exposição das zonadesinas a hora zero e a diminuição do número de espermatozoides ligados aos oócitos. Do ponto de vista estrutural, ocorre alteração nos microtúbulos, com alteração na conformação, arranjo alterado e acréscimo de micro túbulos (ZHOU *et al.*, 2013).

Ao se avaliar os efeitos da supressão e reposição androgênica em ratos, através da orquiectomia e da administração de propionato de testosterona, respectivamente, verificou-se o perfil de expressão na cabeça do epidídimo mediante a estas alterações hormonais. Dentre as 23 β -defensinas estudadas, 16 apresentaram-se responsivas a reposição androgênica, sendo totalmente (β -defensinas 18, 19, 20, 39, 41 e 42) ou parcialmente (β -defensinas 15, 22, 30, 34, 37, 40, 45, 51, 52 e Spag 11a) dependentes dos andrógenos. Outras 6 β -defensinas (β -defensinas 1, 12, 13, 29, 35 e Spag 11b/c) não demonstraram variação em decorrência dos fatores estudados, enquanto a β -defensina 25 apresentou-se como dependente de fatores testiculares. Além disso, 12 β -defensinas apresentaram expressão diferenciada em detrimento de receptores androgênicos (HU *et al.*, 2014).

Esta relação com a fisiologia reprodutiva fica clara em recentes trabalhos que demonstraram que a expressão da β -defensina 42 de ratos liga-se na região acrossomal da cabeça do espermatozoide, sendo expressa nas porções iniciais da cabeça do epidídimo. Esta proteína é secretada pelas células principais epididimárias e está relacionada com o sistema imune inato e com a fertilidade (XIN *et al.*, 2015). Outro exemplo é o estudo o *knockout* de nove genes de β -defensinas (1, 2, 9, 10, 11, 13, 15, 35 e 50) em ratos, resultando em extensas perdas reprodutivas como aumento de cálcio

intracelular, capacitação precoce, desestabilização microtubular e aumento de reação espontânea do acrossoma, quando comparados aos animais controles (DORIN, 2015).

O trabalho de Hall e colaboradores em 2002 já indicava o potencial das β -defensinas na defesa do trato reprodutivo masculino (HALL *et al.*, 2002). Posteriormente a β -defensina 126 humana foi identificada como protetora espermática no trato reprodutivo feminino (YUDIN *et al.*, 2005). Esta característica é essencial, uma vez que o espermatozoide é um corpo estranho no trato reprodutivo feminino e tende a ser atacado e repellido através da imunidade inata (HAFEZ e HAFEZ, 2004; TIZARD, 2014).

A proteção ao espermatozoide se dá através da mediação do imuno reconhecimento e da ligação de anticorpos anti-espermatozoide, alterando a fagocitose e a tolerância imune maternal (SCHUBERTH *et al.*, 2008). Além disso, a β -defensina humana 126 está relacionada com a capacidade de ligação do espermatozoide com o epitélio do oviduto de primatas não humanos, auxiliando assim na manutenção dos espermatozoides no local da fertilização (TOLLNER *et al.*, 2008a), bem como em fenótipos de subfertilidade decorrentes de alterações gênicas (TOLLNER *et al.*, 2011). Estes resultados, embora encontrados em humanos e primatas não humanos, permitem um breve esclarecimento da atuação das proteínas secretadas no epidídimo e que podem posteriormente ser relacionadas com as β -defensinas em suínos. No entanto, ainda não identificou-se proteínas com alto grau de parentesco com a β -defensina humana 126 em suínos (CHOI *et al.*, 2012). O estudo de proteínas com semelhante potencial reprodutivo a β -defensina humana 126, pode auxiliar no desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas (TOLLNER *et al.*, 2012).

Em bovinos estudaram-se biomarcadores reprodutivos, sendo algumas β -defensinas apresentaram níveis elevados de expressão em touros e ausência em bezerros aos 43 dias, demonstrando estarem envolvidas em processos de maturação espermática, alocadas na classe A. Estas proteínas da classe A possuem expressão predominantemente epididimária, podendo seus níveis de expressão serem futuramente utilizados como marcadores moleculares para a seleção de reprodutores (NARCIANDI *et al.*, 2011). O papel dos receptores na função das defensinas já está estabelecido, sendo que o estudo de mediadores imunológicos, como o receptor TOLL, e a sua interação com a expressão de β -defensinas vem sendo realizado em tecidos de suínos e demonstra haver expressão diferenciada, tanto os receptores TOLL quanto das β -defensinas, em decorrência do

tecido estudado. Os receptores tipo TOLL estão relacionados com o reconhecimento de microrganismos e com a manutenção do status imunitário em diferentes órgãos, possuindo relação com as defensinas expressas em tecidos epiteliais, sítios de grandes desafios microbiológicos (MARANTIDIS *et al.*, 2015). Já os receptores tipo PGRPs (*peptidoglycan recognition proteins*), receptores de reconhecimento de peptidoglicanos, estão relacionados ao reconhecimento de microrganismos e medeiam expressão de β -defensinas. Em estudo no qual realizou-se o silenciamento e a super expressão de 2 genes PGRPs em suínos, sendo um deles expresso constitutivamente e o outro com expressão induzida, verificou-se que em ambos os ensaios houve variação no nível de expressão de β -defensinas, demonstrando assim, respectivamente regulação efetora e inibitória das PGRPs em relação as β -defensinas (SANG *et al.*, 2005).

A expressão de β -defensinas humanas varia de acordo com as regiões do epidídimo. Em estudos publicados em 2003, 2007 e 2012 comprovou-se que a maioria das β -defensinas humanas apresenta seu maior nível de expressão no corpo do epidídimo, compartilhando dos níveis metabólicos deste local (RODRIGUEZ-JIMENEZ *et al.*, 2003; THIMON *et al.*, 2007; BELLEANNEE *et al.*, 2012). Em contraponto, a β -defensina humana 126, anteriormente citada, apresenta níveis crescentes de expressão em cabeça, corpo e cauda epididimal. Esta diferença pode estar relacionada a sua função metabólica, visto que a mesma protege o espermatozoide do muco cervical e auxilia na interação com a zona pelúcida (BELLEANNEE *et al.*, 2012). Neste sentido cabe ressaltar que os níveis de expressão destas proteínas variam em relação da sua funcionalidade, expressas mais ou menos em determinadas porções do trato reprodutivo feminino (CHEN *et al.*, 2010) e masculino (RODRIGUEZ-JIMENEZ *et al.*, 2003).

Os níveis de expressão local possuem atividade semelhante em bovinos, visto que o melhoramento genético voltado para a produção leiteira, ocasionou diminuição dos níveis de expressão de algumas β -defensinas (NARCIANDI *et al.*, 2011), identificando alguns polimorfismos que podem ser utilizados como marcadores genéticos reprodutivos. Além disso, os níveis de expressão em bovinos foram maiores na cabeça do epidídimo, diferentemente dos humanos (BELLEANNEE *et al.*, 2012). Tais resultados são semelhantes aos obtidos na comparação dos níveis de expressão em suínos híbridos e suínos da raça Meishan, descritos abaixo, visto que o aprimoramento genético para a produção leiteira (NARCIANDI *et al.*, 2011) e produção de carne (CHEN *et al.*, 2010;

CHENG *et al.*, 2015) não visa primariamente os aspectos imunitários. De modo simples, a seleção de animais geneticamente superiores, tanto bovinos quanto suínos, prioriza fenótipos de alta produtividade, gerando assim, mesmo que involuntariamente, fenótipos com menor expressão fenotípica imunológica.

A expressão de algumas β -defensinas suínas em tecido reprodutivo masculino e feminino (pBD 1, 3, 4, 108, 114, 123, 125 e 129) varia de acordo com o sítio estudado. Em ovário e oviduto foram amplamente expressas as β -defensinas 1 e 108. Em testículo foram encontrados altos níveis de expressão das defensinas 1 e 3, enquanto as β -defensinas expressas em epidídimo foram as 4, 108, 114 e 123. Dentre estas, 4, 108 e a 123 foram expressas somente no epidídimo (MARANTIDIS *et al.*, 2015). Estes resultados reforçam os encontrados por SANG e colaboradores em 2006.

Ao abordar as β -defensinas em âmbito proteômico, há um grande campo de pesquisa a ser avançado. Os mecanismos de capacitação espermática, quimiotaxia, reconhecimento e ligação a zona pelúcida, além da proteção espermática devem ser estudados com o propósito de identificar componentes proteômicos que produzam alterações fenotípicas (DORUS *et al.*, 2012; HOLLAND e OHLENDIECK, 2015). A padronização de técnicas de espectrometria de massas, através do ensaio de monitoração de reações selecionadas com intuito de identificar as β -defensinas humanas 1 a 4 em amostras de tecidos biológicos e de cultura de tecidos foi desenvolvida em estudo. A padronização de testes proteômicos para β -defensinas é indicado visto que pode-se realizar um maior número de ensaios a um menor custo, quando comparado aos estudos utilizados rotineiramente envolvendo anticorpos. Além disso estes estudos utilizam quantidades menores de analito, fato este que pode ser relevante ao se tratar de amostras biológicas (KALLO *et al.*, 2015).

Do ponto de vista da ciência aplicada, interações de β -defensinas com fenótipos já foram estudadas, obtendo resultados promissores. Os suínos da raça Meishan são reconhecidos por suas características de resistência a doenças, status imunitário e prolificidade. Neste contexto estudou-se a expressão das β -defensinas suínas 1, 2 e 3 em vários tecidos, de suínos da raça Meishan e suínos híbridos, dentre eles mucosa oral, língua, fígado, rim, ovário e testículo. Encontraram-se níveis gerais maiores de expressão nos suínos Meishan, comparados aos híbridos. Os maiores níveis de expressão na raça

Meishan foram na língua e na cavidade oral, para as três β -defensinas estudadas, bem como nos suínos híbridos para a expressão das β -defensinas 1 e 3, enquanto a β -defensina 2 possuiu uma maior expressão no fígado e rim dos suínos híbridos. Do ponto de vista reprodutivo, detectou-se maior expressão em ovários de fêmeas Meishan comparados à suínos híbridos, podendo esta característica estar atrelada com a prolificidade das fêmeas Meishan (CHEN *et al.*, 2010).

Na comparação de suínos Yorkshire e tibetanos, na investigação da expressão de receptores tipo TOLL e peptídeos antimicrobianos reiterou-se que a expressão destas proteínas relacionadas com as defesas primárias e com a imunidade inata ocorrem mais frequentemente em suínos tibetanos. Os suínos tibetanos possuem menor refinamento genético e foram mantendo ao longo das gerações as características imunitárias, apresentando assim, maior resistência a doenças. Dos tecidos utilizados, sangue, linfonodos e tonsilas apresentaram diferença significativa, sendo maiores nos suínos tibetanos (CHENG *et al.*, 2015).

Estudos com bovinos (NARCIANDI *et al.*, 2011), suínos (CHOI *et al.*, 2012) e ovinos (SOUZA *et al.*, 2015) demonstraram haver polimorfismos de nucleotídeos em β -defensinas. Estes polimorfismos se caracterizam pela troca de nucleotídeos, podendo ocasionar a tradução diferenciada de aminoácidos no qual o polimorfismo está expresso. Isto serve como orientação para o estudo da função destas proteínas em diferentes animais, possibilitando identificar marcadores moleculares relacionados a fenótipos desejáveis ou indesejáveis (NARCIANDI *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2015).

A utilização de dados obtidos através do conhecimento das β -defensinas em bovinos tende a ser usado como mecanismo de promoção de sanidade animal. Estudos mais aprimorados fazem-se necessários para aplicação desta biotecnologia, de modo que as tendências de utilização biotecnológicas como efeito antimicrobiano, adjuvante vacinal, marcadores moleculares reprodutivos e manipulação dietética possam se cumprir (MEADE *et al.*, 2014). Os bovinos são os animais domésticos nos quais há maior número de β -defensinas já identificadas, cerca de 106, auxiliando assim na determinação da importância fisiológica destas proteínas (BOVINE GENOME *et al.*, 2009). Neste contexto o estudo biotecnológico de β -defensinas é fator crítico, tanto em bovinos quanto em suínos, podendo ser utilizado como ferramenta biotecnológica zootécnica.

A utilização da β -defensina 1 suína demonstrou resultados satisfatórios quanto a diminuição das lesões provocadas pela bactéria *Bordetella pertusis*, patógeno respiratório responsável por grandes perdas produtivas e econômicas na suinocultura, demonstrando estreita relação com a imunidade inata. A utilização de β -defensina 1 não teve efeito benéfico na infecção por *Bordetella bronchiseptica*, apesar de pertencer ao mesmo gênero da *B. pertusis*. Esta variação se deve provavelmente a adaptações que a *B. bronchiseptica* adquiriu a fim de evadir-se do sistema imune (ELAHI *et al.*, 2006).

Ao se avaliar os efeitos da adição de β -defensina suína 2 via retal, em ratos com colite induzida por dextrano sulfato de sódio, verificou-se que esta proteína apresentou efeito protetor e manteve a integridade epitelial intestinal. Este fenômeno protetivo ocorreu devido a inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios e inibição de algumas vias de sinalização celular, envolvendo NF-kB (HAN *et al.*, 2015). Estas vias de sinalização envolvendo β -defensinas, imunidade e efeitos antimicrobianos necessitam de mais pesquisa e de comprovação científica, para que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de possíveis biomarcadores ou fármacos, diminuindo a toxicidade e otimizando a aplicação (MARTIN *et al.*, 2015).

A superexpressão da β -defensina 2 suína, presente fisiologicamente em tecidos epiteliais, através da clonagem de células somáticas, conferiu maior resistência ao desafio por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Este agente é conhecido como causador de grandes perdas econômicas na suinocultura e a resistência concedida através da superexpressão desta β -defensina pode modificar a resistência orgânica a doença e o padrão de uso de antimicrobianos (YANG *et al.*, 2015).

A suplementação de β -defensinas em dietas de suínos tende a auxiliar na melhora da conversão alimentar, da digestibilidade alimentar e da morfologia intestinal (XIAO *et al.*, 2015). Além disso, o uso de β -defensinas vem sendo vinculado a uma melhora nos parâmetros enzimáticos em resposta a aplicação de micotoxinas na dieta (XIAO *et al.*, 2013), surgindo como alternativa ao uso de sequestrantes de micotoxinas.

Soluções biotecnológicas para determinadas situações já haviam sido propostas em 2006 (KLUVER *et al.*, 2006), citando possíveis dificuldades e elucidando a atual situação biotecnológica. Desde lá, algumas biotecnologias como clonagem e expressão de β -defensinas em vetores já foram descritas na literatura (LI *et al.*, 2013a; LI *et al.*,

2013b). O desenvolvimento de metodologias de aplicação destas proteínas em doses refrigeradas de sêmen suínos, pode prover características de maior prazo de validade, maior resistência a contaminação microbiana e melhor manutenção da viabilidade espermática (LI *et al.*, 2013a).

O desenvolvimento de análogos sintéticos de β -defensinas, como ferramenta biotecnológica, possui alguns gargalos quanto à sua aplicabilidade. A β -defensina suína 1 foi estudada, sendo encontrados altos níveis de expressão no epitélio lingual, nas células filiformes. Após clonagem e expressão em vetores pode-se observar que a mesma possuía efeito antimicrobiano contra *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Lysteria monocytogenes*, além de efeito contra *C. albicans*. Com o aumento da concentração salina no soluto esta proteína perde sua eficácia, porém ainda apresenta efeitos sinérgicos quando em conjunto com outros peptídeos antimicrobianos (SHI *et al.*, 1999).

A β -defensina suína 2, com expressão tecidual no epitélio intestinal, possui atividade antimicrobiana e antiviral. A fim de analisar os efeitos desta proteína sobre conhecidas populações bacterianas realizaram-se ensaios *in vitro* com microrganismos e concentrações de soluções diferentes. Como já era esperado, o aumento da concentração salina diminuiu o efeito das β -defensinas, se tornando assim um dos principais gargalos biotecnológicos para o processamento biotecnológico. Esta alteração na atividade se deve a quebra da interação entre a membrana bacteriana carregada negativamente e o peptídeo carregado positivamente (VELDHUIZEN *et al.*, 2008).

Os efeitos antimicrobianos da β -defensina suína 2 foram obtidos com baixas concentrações (16 a 32 ug/mL) para *L. monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *S. typhimurium*, enquanto as bactérias *Clostridium perfringens*, *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica* somente apresentaram uma redução logarítmica na contagem de unidades formadoras de colônias com 64 a 128 ug/mL de β -defensina suína 2. Em se tratando de *S. typhimurium* o efeito foi estudado através de microscopia, demonstrando formação de vacúolos, retração da membrana citoplasmática, lesões em septos da membrana e formação de células fantasmas. Além disso, não houve alteração eritrocitária nos estudos *in vitro*, bem como não houve efeito sobre vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (VELDHUIZEN *et al.*, 2008).

As β -defensinas humanas 1, 2 e 4 possuem sua atividade reduzida em soluções salinas, diferentemente da β -defensina humana 3, interferindo no efeito terapêutico destas β -defensinas. Assim, a produção de β -defensinas resistentes a soluções salinas foi estudada, desde a construção do modelo peptídico, passando pela síntese e pelas modificações pós-traducionais, até se obter a defensina. Alterações nos resíduos terminais e nas condições de oxidação/redução foram realizados e após os peptídeos foram analisados, sendo avaliadas atividades antibacterianas, antivirais e quimiotáticas, bem como a resistência a soluções salinas. De posse dos resultados dos ensaios, dois peptídeos, análogos 1C e 3I, foram identificados como promissores, podendo vir a ser utilizados futuramente (SCUDIERO *et al.*, 2010).

De posse dos resultados satisfatórios dos análogos 1C e 3I das β -defensinas humanas e através do conhecimento de que a proteólise se inicia no C terminal e termina na primeira cisteína, estabeleceu-se uma β -defensina quimérica, denominada 3NI. Ao se testar as β -defensinas, entre elas as β -defensinas 1 e 3 “selvagens”, a 1C, 3I, 3N e 3NI, obteve-se que a forma 3NI apresentou elevada atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Enterococcus faecalis*, além de possuir efeito contra *Herpes vírus simplex*. As proteínas sintéticas também não apresentaram efeito apoptóticos significativos em 3 linhagens celulares estudadas (SCUDIERO *et al.*, 2013).

O presente trabalho aborda a expressão gênica das β -defensinas suínas 3, 4, 125 e proteína epididimária 2C (pEP2C). A seguir, estas serão discutidas em destaque.

Beta defensina suína 3 - pBD3

A β -defensina suína 3 possui homologia com a β -defensina 103 em humanos e bovinos (CHOI *et al.*, 2012), com cães (LEONARD *et al.*, 2012) e equinos (LOOFT *et al.*, 2006). Nestas espécies, estas defensinas são expressas em órgãos linfoides, testículo e epidídimo (PATIL *et al.*, 2005), com marcada ação no sistema imune e na quimiotaxia. Em bovinos, a defensina 103 está relacionada com imunidade, visto que desafios com Herpes vírus maximizam a expressão da mesma. Além disso, ocorre uma diminuição da expressão com o avançar da idade dos animais, fato este relacionado com a imunidade etária e com o menor desafio imune (MIRABZADEH-ARDAKANI *et al.*, 2016). Em humanos, a expressão da β -defensina 103, homologa a pBD3, está vinculada a infecção por *Staphylococcus aureus*, embora o mecanismo exato não esteja perfeitamente

elucidado (FODE *et al.*, 2011). Além disso, a β -defensina humana 103 age como citocina, participando da regulação de fenômenos quimiotáticos (HARVEY *et al.*, 2013).

Em suínos, a pBD3 é expressa em tecidos linfoides, duodeno, fígado, pele, testículo e porção proximal do epidídimo. A expressão dessa defensina em órgãos do sistema imune, relaciona a imunidade inata e adaptativa, bem como a apresentação de antígenos, com o desafio local (SANG *et al.*, 2006). Corroborando com os resultados de Sang, Chen e seu grupo descreveram a expressão da pBD3 em órgãos do sistema imune, bem como em órgãos reprodutivos. A expressão em órgãos reprodutivos foi menor do que a apresentada por Sang, provavelmente devido ao fato dos suínos utilizados encontrar-se em uma faixa etária mais elevada. A expressão da pBD3 em ovários de fêmeas da raça Meishan, reconhecidos pela sua alta prolificidade e rusticidade, foi maior do que nos suínos obtidos através de cruzamento industrial. Estes dados necessitam de uma análise mais acurada, mas podem indicar que a maior expressão da pBD3 no trato reprodutivo de fêmeas Meishan altera as taxas de prolificidade (CHEN *et al.*, 2010). Contudo, a expressão da pBD3 em suínos da raça tibetana, reconhecidos pela sua baixa prolificidade, é maior em ovários do que nos suínos obtidos através de cruzamento industrial. A expressão testicular e epididimária da pBD3 em suínos tibetanos não apresentou variação, porém as β -defensinas suínas 1 e 2 apresentaram menor expressão nos suínos tibetanos, se comparados aos suínos obtidos de cruzamento industrial (QI *et al.*, 2009). Estes estudos envolvendo raças de suínos com diferentes perfis de prolificidade auxiliam a descrever a expressão das defensinas nos órgãos reprodutivos, porém pesquisas envolvendo um maior número de raças e de animais se faz necessário para que se possa identificar adequadamente o papel das β -defensinas na reprodução.

Beta defensina suína 4- pBD4

A pBD4, também conhecida como defensina 110, é filogeneticamente homóloga a defensina 110 em humanos e 111 em bovinos (CHOI *et al.*, 2012). Em suínos a expressão é mais intensa em pulmão e porção distal do epidídimo, embora seja descrita em vários outros tecidos (SANG *et al.*, 2006), apesar de Choi e colaboradores verificarem que a pBD4 possui alta expressão em testículo (CHOI *et al.*, 2012). A principal atividade desta defensina é a resposta imune contra microrganismos e a atividade na resposta imune inata (SANG *et al.*, 2006).

Beta defensina suína 125 - pBD125

A β -defensina suína 125 é filogeneticamente homóloga a defensina 125 em humanos e bovinos (CHOI *et al.*, 2012), sendo também conhecida em humanos como defensina 25 (RODRIGUEZ-JIMENEZ *et al.*, 2003). Em suínos esta defensina é expressa no pulmão, timo e epidídimo, com expressão diferencial entre as porções epididimárias (SANG *et al.*, 2006). Em seres humanos, a defensina 25 é constitutivamente expressa no trato genital masculino, apresentando 1000 vezes mais abundância na porção da cabeça proximal se comparada com outras porções epididimárias, demonstrando um padrão específico de expressão (RODRIGUEZ-JIMENEZ *et al.*, 2003), diferente da maioria das defensinas, que possui maior expressão no corpo do epidídimo (SYNTIN *et al.*, 1999; DACHEUX *et al.*, 2006; THIMON *et al.*, 2007).

Proteína epididimária 2C – pEP2C

A pEP2C, também denominada como SPAG11B, possui uma abundante expressão gênica em vários sítios teciduais (SANG *et al.*, 2006), podendo ser usada como marcador de função epididimária. Em camundongos, a família da defensina SPAG11, homóloga a pEP2C, apresenta uma resposta variável frente a depleção androgênica. Em camundongos castrados e com posterior reposição androgênica, a SPAG11a apresentou uma resposta parcial frente a reposição de andrógenos, enquanto as defensinas SPAG11b/c não responderam a reposição androgênica (HU *et al.*, 2014). Em ratos, a expressão da SPAG11c diminui após orquiectomia, aumentando posteriormente em detrimento de reposição androgênica (RIBEIRO *et al.*, 2015). Estes resultados corroboram com o fato de que existem mais fatores que alteram a expressão gênica em testículo e epidídimo do que somente os andrógenos, visto que a expressão das defensinas responde diferentemente a manipulação androgênica. Em suínos, a expressão da pEP2C foi aumentada com o uso de butirato, em estudos *in vitro*, devido ao fato que a o butirato promove a redução da ação da desacetilase, aumentando assim a expressão da pEP2C (ZENG *et al.*, 2013).

A defensina humana e primata EP2C, homóloga a pEP2C, apresenta expressão testicular e epididimária em *Macaca mulata*, apresentando em humanos somente expressão epididimária (AVELLAR *et al.*, 2004). A expressão das proteínas da família EP2 é andrógeno dependente e específica para epidídimo em humanos (FROHLICH *et*

al., 2001). A defensina SPAG11B em humanos é associada ao espermatozoide através da interação de proteínas como *attractin*, *tetraspanin* e *tryptase alpha/beta*, implicadas na defesa do hospedeiro e em funções reprodutivas (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009).

2.3.4 O suíno imunocastrado como modelo animal para estudo do hipogonadismo

A esterilização empregada em animais de criação ainda é cercada por uma série de questionamentos técnicos e filosóficos. Do ponto de vista técnico tem-se que a esterilização ou castração, no macho e em alguns casos na fêmea, é um procedimento usual e já inserido nas atividades corriqueiras. Porém, devido a uma série de atribuições, tanto comportamentais, quanto relacionadas ao bem estar animal, estas atividades estão sendo gradativamente banidas ou tendo suas técnicas modificadas. A castração cirúrgica em suínos, mais especificamente em leitões, amplamente difundida entre produtores e técnicos, dá lugar a metodologias alternativas. A imunização contra o GnRH é uma destas metodologias, que é por sua vez menos traumática e menos invasiva, propiciando assim condições adequadas para que se possa consumir a carne destes animais, sem prejuízo ao consumidor (BAUER *et al.*, 2008; HUBER-EICHER e SPRING, 2008)

A utilização de inibidores hormonais é uma alternativa de esterilização menos invasiva que as anteriores que vem sendo largamente utilizada em sistemas de produção de suínos. A aplicação de fármacos inibidores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é uma opção que possibilita o abate de suínos sem a necessidade de realização de procedimentos cirúrgicos. O protocolo de inibição do GnRH é alcançado mediante a administração de duas doses de Improvac® (anti-GnRH), diminuindo o crescimento testicular e a formação de testosterona, que por sua vez, diminuem os níveis séricos de androstenona e escatol (DUNSHEA *et al.*, 2001; ABCS, 2014). Através deste protocolo obtêm-se o suíno com hipogonadismo, modelo animal a ser utilizado nesta pesquisa.

A inibição do GnRH a nível hipotalâmico, suprime a liberação de LH e FSH na hipófise anterior, inibindo a esteroidogênese e os metabólitos responsáveis pelo odor da carcaça de suínos inteiros, depreciada pelo consumidor. No entanto, o hormônio do crescimento permanece com níveis semelhantes a animais inteiros e níveis maiores do que animais castrados cirurgicamente. O motivo pelo qual este hormônio está com maiores concentrações nos animais castrados imunologicamente do que os castrados

cirurgicamente ainda não é bem esclarecido, embora alguns autores considerem esta diferença em detrimento do momento da castração, que ocorre na primeira semana de vida nos animais castrados cirurgicamente, enquanto nos animais imunizados ocorre cerca de 8 semanas antes do abate (BAUER *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação de Improvac® (ZOETIS, 2015) se baseia na produção de anticorpos contra o GnRH, atuando efetivamente cerca de 7 a 10 dias após a segunda aplicação. Neste protocolo são necessárias duas aplicações com intervalo de no mínimo 4 semanas, sendo a segunda dose de 4 a 5 semanas antes do abate. A supressão hormonal gera um decréscimo na produção e acúmulo de androstenona e escatol e aumenta a metabolização destes compostos já presentes no suíno. A utilização de Improvac® diminuiu em 100% os níveis detectáveis de androstenona e escatol, suprimindo, consequentemente, o odor de suíno inteiro (DUNSHEA *et al.*, 2001). Além da supressão do odor encontraram-se resultados positivos na diminuição de lesões devido a brigas, no aumento do ganho de peso e da ingestão diária, porém com um leve aumento na espessura de toucinho. A utilização de Bopriva® (PFIZER, 2015), análogo do anti-GnRH utilizado em bovinos, apresentou experimentalmente uma supressão mais duradoura da função hormonal e gametogênica, embora sua utilização em suínos ainda não seja aprovada (WICKS *et al.*, 2013).

A supressão androgênica estudada em ratos pré púberes demonstrou haver uma alteração na expressão de determinadas proteínas, afetando assim a função testicular adulta. Apesar de não ter havido modificações estruturais e histológicas testiculares, a supressão hormonal já apresentou alterações em idade pré púbere (PEROBELLI *et al.*, 2013), o que é um forte indicativo de alterações na expressão gênica de β -defensinas mediante indução de hipogonadismo por supressão androgênica.

As alterações decorrentes da imunização contra o GnRH incluem a redução do peso e tamanho testicular. Do ponto de vista histológico ocorre a diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, diminuição do tamanho das células de Leydig, responsável pela produção da testosterona e aumento relativo do tamanho das células de Sertoli, responsáveis pelo controle da maturação e migração das espermatogônias. Ocorre também diminuição do número de espermatogônias com sinais mitóticos no parênquima testicular, fato este que corrobora com a menor quantidade de espermatozoides encontrados nos túbulos seminíferos e no restante do trato reprodutivo. Além da

diminuição do número de espermatozoides, ocorre uma liberação precoce das espermátides, que ainda não estão fisiologicamente maduras (HILBE *et al.*, 2006).

A imunização contra o GnRH é um procedimento reversível, visto que ocorre uma normalização da atividade ao decorrer do tempo. Mesmo após a retomada da produção de andrógenos, com concentrações de testosterona superior a 0,5ng/mL, ainda são necessárias no mínimo 13 semanas a fim de que a espermatogênese esteja completa (ROTTNER e CLAUS, 2009).

Os estudos de depleção androgênica utilizam rotineiramente modelos animais com uma curta duração da depleção androgênica, de poucos dias a algumas semanas, conforme tabela 1 (SMITHWICK e YOUNG, 2001; PALLADINO *et al.*, 2003; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2005; LYDKA *et al.*, 2011). O modelo animal suíno imunizado contra o GnRH, utilizado nesta pesquisa, apresenta no momento da análise, uma condição fisiológica de 8 semanas de privação androgênica, representando assim, um período maior de privação. Além disso, o método de privação androgênica através da castração, elimina os fatores testiculares, que interferem na atividade epididimária.

Tabela 1 - Metodologias utilizadas em estudos de depleção androgênica em diferentes espécies com tempo de privação androgênica empregada.

Autor	Ano	Método de privação androgênica	Espécie	Duração da privação
Ibrahim et al	2001	Castração e ligação do ducto eferente	Ratos	Até 15 dias
Smithwick et al	2001	Bloqueador de GnRH	Chimpanzee	Até 21 dias
Palladino et al	2003	Castração	Ratos	Até 15 dias
Radhakrishnam et al	2005	Castração	<i>Macaca mulatta</i>	Até 6 dias
Lydka et al	2011	Flutamida 50mg/kg	Suínos	Até 270 dias
Zhao et al	2011	Castração	Ratos	Até 7 dias
Perobelli et al	2012	Flutamida 25 mg/kg	Ratos	Até 36 dias
Pujianto et al	2013	Castração	Camundongos	Até 5 dias
Hu et al	2014	Castração	Camundongos	Até 7 dias

A imunização de suínos contra o GnRH altera a expressão gênica das proteínas chaperonas PDIA3 e PDI, importantes para a remodelagem proteica. Em estudo comparando a expressão destas proteínas em suínos imunizados contra o GnRH, modelo animal utilizado nessa dissertação, pode-se notar que ocorre variação após a imunização e que as alterações incluem o aumento e a diminuição da expressão. No caso da PDIA3

no fluido epididimário, ocorre diminuição da expressão na cabeça e corpo do epidídimo, bem como ocorre aumento da expressão na cauda do epidídimo. Estes dados indicam que as proteínas chaperonas acima citadas são andrógeno dependentes, porém fatores luminais e intrínsecos também atuam para o controle da expressão (SCHORR-LENZ *et al.*, 2016).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção será subdividida em dois experimentos, englobando (1) a proteômica do espermatozoide da cauda do epidídimo e (2) a regulação hormonal da expressão de β -defensinas nas diferentes regiões epididimárias.

3.1 Experimento 1 – Descrição das proteínas encontradas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo.

3.1.1 Animais e coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo

Dez suínos saudáveis e sexualmente maduros das raças Large White, Duroc e Landrace, em rotina de coleta de sêmen em Central de Inseminação foram utilizados no estudo. Os animais permaneceram alojados em baias individuais e alimentados com dieta comercial contendo milho e farelo de soja e água *ad libitum*, de acordo com os requerimentos para espécie e idade (NRC, 2012). Realizou-se a orquiectomia bilateral, retirando-se também os epidídimos, que foram imediatamente dissecados. Dissecou-se a região 9 do epidídimo, correspondente a cauda epididimária, conforme metodologia de Dacheux, 2005 (Figura 1), retirando-se o fluido espermático e os espermatozoides em tubos. Os espermatozoides foram separados do fluido epididimário através de centrifugação (4.000 xg por 10 minutos em temperatura ambiente) e os pellets (cerca de 10^7 espermatozoides) foram posteriormente lavados por três vezes com 1 mL de solução fosfato salina (1400 mM NaCl, 15 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4), centrifugados e ressuspensos em 0,5 mL de Buffer RIPA (25mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% (w/v) deoxicolato de sódio, 0.1% (w/v) SDS) com inibidor de protease Cocktail (Pierce). A suspensão obtida foi suavemente agitada, lisada e centrifugada a 12.000 xg durante 1 hora a 4°C. Adicionou-se coquetel de inibidor de

protease (Pierce) e o sobrenadante (extrato de proteínas espermáticas) foi armazenado a -80°C até o momento da análise.

3.1.2 Preparação de extratos de proteínas de espermatozoides

Amostra de espermatozoides da cauda do epidídimo ($n = 10$) foram juntadas em *pool* em quantidades semelhantes (300 μg de proteína total) e ressuspendidas em tampão de digestão (8 M uréia, 100 mM Tris-HCl pH 8,5). As proteínas foram reduzidas com 5 mM tris-2-carboxyethyl-phosphine (TCEP) por 20 minutos em temperatura ambiente, seguida de alquilação com 10 mM iodoacetamida em temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. Após a adição de 1 mM CaCl_2 (concentração final), a digestão proteica foi realizada com 2 μg de tripsina (Promega, Madison, WI) por incubação a 37°C por 16 h. A proteólise foi interrompida com a adição de ácido fórmico até a concentração final de 5%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 20 min, e o sobrenadante armazenado a -80°C .

3.1.3 MudPIT

A análise proteômica foi realizada através de colaboração com o laboratório Yates, em San Diego, na Califórnia. As amostras digeridas foram carregadas em um capilar de 250 μm i.d. empacotado com 2,5 cm de 55 μm Luna strong cation exchanger (SCX) (Whatman, USA), seguido de 2 cm de Aqua C18 reversed phase 3 μm (RP) (Phenomenex, USA) com frit de 1 μm . A coluna foi então lavada com tampão (95% água, 5% acetonitrila e 0,1% ácido fórmico), sendo após acoplado a coluna um capilar de 100 μm i.d. com pulled tip de 5 μm empacotado com 11 cm Aqua C18 resina de 3 μm (Phenomenex, USA).

As colunas montadas foram instaladas em um HPLC quaternário Agilent 1100 e analisado usando uma separação modificada de 12 passos (Washburn et al; 2001; Santi et al., 2014). As soluções utilizadas foram tampão A (5% acetonitrila e 0,1% ácido fórmico), tampão B (80% acetonitrila e 0,1% ácido fórmico) e Tampão C (500 mM de acetato de amônio, 5% acetonitrila e 0,1% ácido fórmico). O passo 1 consistiu de 70 min de gradiente 0-100% (v/v) do tampão B. Os passos 2-10 tiveram perfil semelhante, com as seguintes mudanças: 3 min em 100% (v/v) do tampão A, 3 min em X% (v/v) do tampão

B, 4 min em gradiente 1 a 10% (v/v) do tampão B, e 101 min gradiente de 10 a 100% (v/v) do tampão B. As percentagens (X) no passo de 3 minutos com tampão C foram 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, e 100% (v/v). Um passo adicional de 3 min em 100% (v/v) com tampão A, 3 min em 90% (v/v) com tampão C e 10% (v/v) com tampão B, e 110 min em gradiente de 10-100% (v/v) com tampão B foi realizado. Três replicatas (corridas técnicas) foram realizadas.

3.1.4 Espectrometria de massa

Os peptídeos foram eluídos da coluna microcapilar foram injetados por eletrospray (2.4 kV spray voltage) em um espectrômetro de massa LTQ Orbitrap-XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Um ciclo de escaneamento de espectro completo (400–2000 m/z, resolução de 60000) seguido de cinco espectros MS/MS data-dependente (com energia de colisão normalizada a 35%) foi repetido continuamente durante cada passo da separação multidimensional. Para prever análises repetidas, foi utilizada a exclusão dinâmica com uma contagem de repetição de 1, duração de repetição de 30 segundos, e uma lista de exclusão de 150 segundos e duração de 180 segundos. O sistema de dados Xcalibur (Thermo, USA) foi utilizado para controlar a aplicação das funções de escaneamento do espectrômetro de massa e os gradientes de solventes no HPLC.

Espectros MS/MS foram analisados usando os protocolos de softwares a seguir, propostos em 2014 (SANTI *et al.*, 2014). A identificação das proteínas e quantificação foram realizadas com o Integrated Proteomics Pipeline (www.integratedproteomics.com/). Os espectros de massa em tandem foram extraídos em arquivos ms2 a partir de arquivos brutos (raw) via RawExtract 1.9.9 9 (MCDONALD *et al.*, 2004) e foram buscados através do algoritmo ProLuCID em base de dados de proteínas de *Sus scrofa* obtido em julho de 2015. A tolerância da pesquisa de massa peptídica foi ajustada para 3 Da, e a carboximetilação (+57.02146 Da) da cisteína foi considerada com uma modificação estática. Os resultados dos parâmetros ProLuCID foram montados e filtrados usando o software DTASelect (TABB *et al.*, 2002), resultando em um conjunto de dados com uma taxa de falsa descoberta de 1%.

3.1.5 Análise de bioinformática

Diversas ferramentas de bioinformática foram utilizadas para extrair o máximo de informações dos dados de proteômica obtidas das amostras de espermatozoides da cauda do epidídimo suíno. O software Blasto2GO (<http://www.blast2go.org>) (CONESA *et al.*, 2005) foi utilizado para categorizar as proteínas detectadas por anotação de ontologia gênica, de acordo com processos biológicos e funções moleculares (ASHBURNER *et al.*, 2000). Também foi utilizado o mapeamento das proteínas utilizando o módulo KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), que permite identificar as funções enzimáticas das proteínas encontradas no contexto de rotas metabólicas nas quais estas proteínas estão envolvidas (GOTZ *et al.*, 2008).

Para verificar outras características e classificar as proteínas identificadas, outras análises de bioinformática foram realizadas. Para identificar a localização subcelular, foi utilizado o software TargetP 1.0 (cutoff >0.9) (EMANUELSSON *et al.*, 2000). Para identificar se a proteína é transmembrana, as sequências de proteínas foram analisadas pelo software TMHMM 2.0 (KROGH *et al.*, 2001), e para verificar se a sequência das proteínas possuíam regiões com peptídeo sinal, utilizou-se o SignalP 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011). Estes softwares estão disponíveis em <http://www.cbs.dtu.dk/services/>.

3.2 Experimento 2 – Regulação hormonal da expressão de β -defensinas no epidídimo de suínos imunizados contra o GnRH

3.2.1 Obtenção das amostras de tecido epididimário e grupos experimentais

Os experimentos utilizaram testículos e epidídimos oriundos de suínos (*Sus scrofa domesticus*) com idade entre 300 e 540 dias, inteiros (machos reprodutores) e imunizados contra o GnRH (modelo animal suíno de hipogonadismo), sendo então divididos em grupos Controle e Imunocastrado, respectivamente. O grupo amostral corresponde a 6 testículos e 6 epidídimos para cada grupo, totalizando 12 animais no estudo.

Os testículos e epidídimos de suínos inteiros (grupo Controle) foram obtidos através de parceria com a Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS), mediante orquiectomia bilateral, realizada pela associação. Após a

orquiectomia os tecidos foram acondicionados em caixas isotérmicas e remetidos até o Laboratório de Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES.

Os testículos e epidídimos de suínos imunizados contra o GnRH (grupo Imunocastrado) foram obtidos mediante doação de abatedouros do Vale do Taquari. Os suínos deste grupo foram imunizados conforme protocolo próprio da empresa, através da utilização de 2-10 GnRF conjugado a Toxóide Diftérico, no período de 8 e 4 semanas antes do abate. Os animais foram posteriormente abatidos conforme regulamentação própria do abatedouro e de acordo com a legislação pertinente. Os tecidos coletados após a castração ou o abate foram acondicionados sob refrigeração (4°C) e posteriormente transportadas até o Laboratório de Biotecnologia da UNIVATES, obedecendo a um período máximo de 1 hora.

3.2.2 Extração de RNA tecidual e síntese de DNA complementar

Após a chegada ao no Laboratório de Biotecnologia da UNIVATES, procedeu-se a dissecação dos testículos e epidídimos, conforme metodologia descrita por Dacheux e colaboradores, 2005, sendo separados em 3 porções epididimárias, definidas como 1, 5 e 9, cabeça, corpo e cauda respectivamente, conforme ilustrado na Figura 1, além de uma porção do parênquima testicular. As porções previamente dissecadas foram submetidas a extração de RNA utilizando o kit GE Healthcare Illustra Spin, utilizando cerca de 100 mg dos tecidos de suínos inteiros e imunocastrados. Após a extração, o precipitado de RNA foi quantificado em espectrofotômetro L-QUANT (Loccus Biotecnologia) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, para padronização das reações com 1,5 µg de RNA. Das amostras extraídas e padronizadas de RNA realizou-se a síntese de DNA complementar (cDNA) através do kit M MLV Reverse Transcriptase, utilizando 1,5 µg de RNA. O cDNA obtido foi armazenado a -80°C até sua utilização.

3.2.3 qPCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando os *primers* (tabela 2) descritos por (SANG *et al.*, 2006) para os genes estudados das β -defensinas 3 (pBD3), 4 (pBD4), 125 (pBD125) e para a proteína epididimária 2C (pEP2C) e utilizando

como gene controle a β -actina (QI *et al.*, 2009). A fim de padronizar a reação realizou-se a PCR convencional, obtendo-se o amplicon. A reação da PCR foi realizada com etapa inicial de desnaturação a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento a 55°C e 40 segundos de extensão a 72°C. Após os 40 ciclos realizou-se uma fase final de extensão de 10 minutos a 72°C (SANG *et al.*, 2006). Para esta reação foram utilizados 16,5 μ L de água ultra-pura, 1 μ L de cDNA, 2,5 μ L de Tampão Buffer 10x ([200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]), 3,0 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 0,2 mM de *primer sense* e *antisense*, 0,5 μ L de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, 5 U/ μ L), 0,5 μ L DMSO, para uma reação com total de 25 μ L. O produto desta reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, em cuba por 50 minutos a 90 Volts, sendo após avaliado através de iluminação ultravioleta a 512 nm, com o uso do equipamento Gel Logic (KODAC®).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi realizada no termociclador *StepOne* (*Applied Biosystems*), utilizando a temperatura de *Melting* de 60 \pm 1°C. O cDNA utilizado foi diluído a 50 vezes, através de curva de diluição. As reações realizadas contavam com 4,14 μ L de água ultra-pura, 2 μ L de Tampão Buffer 10x ([200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]), 3,31 mM de MgCl₂, 0,11 mM de dNTPs, 0,22 mM de cada *primer*, 2 μ L de SYBR green (1:10,000, Molecular Probe), e 0.058 μ L de Platinum Taq DNA Polimerase (5 U/ μ L, Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 2, conforme descritos por Sang *et al.*, (2006) e Qi *et al.*, (2009).

A reação da qPCR contou com uma fase inicial de desnaturação de 15 minutos a 95°C, seguidos de 45 ciclos com 15 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento a 56°C e 30 segundos de extensão a 72°C. Ao término dos 45 ciclos realizou-se uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Realizou-se curva de *Melting* com acréscimo de 0,3°C a cada 30 segundos a fim de determinar a especificidade da reação e dos produtos obtidos, sendo realizadas em todas as reações triplicatas técnicas (RIRIE *et al.*, 1997). A quantificação da expressão foi realizada conforme o método descrito por Pfaffl (2001), normalizando a expressão dos genes em estudo com o gene controle, β -actina (PFAFFL, 2001).

Tabela 2 - *Primers* utilizados para os genes de β -defensinas suínas.

Gene	Primers	Acesso	Amplicon
pEP2C	CCCTTTCCAGGAACCTGAACCAAA TGGCTTGTAGGCTCTGGAGAACAA	BK005522	204 pb
pBD3	CTTCCTATCCAGTCTCAGTGTCTGC GGCTTCTGTAGACTTCAAGGAGACAT	AY460575	308 pb
pBD4	GTGGCTTGGATTTGAGGAGAGAGT AGTGATACACAGGCCTGGAAGGAT	AY460576	232 pb
pBD125	GTGACCAAAGCTGGCTGGAATGTT TCCTGCTCAGTTCCTGTGCTTTCT	BK005520	289 pb
β -actina	GCGAGGCCAGGATGGA CCAGCACCATGAAGATCAAGATCA	LOC396797	81 pb

Fonte: (SANG *et al.*, 2006; QI *et al.*, 2009)

3.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos da expressão gênica foram analisados através da metodologia $2^{-\Delta ct}$ para a normalização dos resultados. Para comparação entre grupos experimentais, procedeu-se análise estatística através do teste t de Student. Para comparação entre regiões, foi utilizada a ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. Para todos os testes assumiu-se um nível de significância estatística de 5%.

3.3 Considerações éticas

A utilização dos animais e dos tecidos está em conformidade com o Comitê de Ética para a utilização de animais, visto que conforme o artigo 1º da Lei 11794, de 8 de outubro de 2008, “A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei”, exceto o disposto no inciso 3 “Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária”. Devido ao fato de que os tecidos utilizados na pesquisa são oriundos de atividades zootécnicas rotineiras e se enquadram no inciso 3º, não se torna necessário o registro junto ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (BRASIL, 2008). Para a realização do projeto, obteve-se parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais, sob protocolo 0001/2015.

4. RESULTADOS

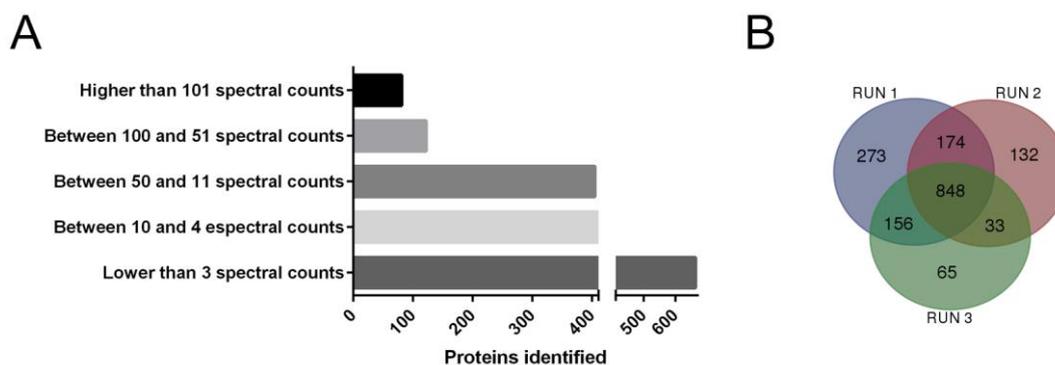
4.1 Proteínas identificadas no espermatozoide da cauda do epidídimo por MudPIT

A análise global da composição proteica do espermatozoide retirado da cauda do epidídimo identificou 2886 proteínas, demonstrando um alto poder de identificação. Após análises globais e aplicação de filtros para a retirada de isoformas de proteínas, obtiveram-se 1681 proteínas. As 1681 proteínas resultantes foram submetidas a análises de bioinformática para obtenção de dados de ontologia gênica e relação com componentes celulares, processos biológicos e funções moleculares.

Considerando a contagem de espectros, 81 proteínas apresentaram mais de 100 *spectral counts*, representando 4,8% das proteínas identificadas e 50,99% dos *spectral counts*. 556 proteínas apresentaram entre 10 e 100 *spectral counts*, representando 33,07% das proteínas identificadas e 41,63% dos *spectral counts*. 1044 proteínas apresentaram contagens menores de 10 *spectral counts*, representando 62,1% das proteínas e 7,3% dos *spectral counts*, conforme disposto na figura 3A..

O estudo proteômico foi conduzido em três ensaios a fim de gerar dados com mais segurança. Das proteínas identificadas, 848 (50,8%) foram identificadas nos 3 ensaios, 363 (21,74%) foram identificadas em no mínimo dois ensaios, enquanto 470 (28,16%) foram identificadas em somente um ensaio (Figura 3B).

Figura 3 - Distribuição das proteínas identificadas (A) e distribuição de Venn entre as corridas (B)



Posterior as análises globais, identificaram-se as 10 proteínas mais encontradas, com base no número de *spectral counts*, sendo: *heat shock 70 kda protein 1-like*, *acrosin-binding protein*, *heat shock 70 kda protein 1b-like*, *beta-enolase isoform x1*, *gamma-enolase*, *phosphatidylethanolamine-binding protein 4 isoform x1*, *zona pellucida-binding protein 1*, *leucine-rich repeat-containing protein 37a-like*, *camp-dependent protein kinase catalytic subunit alpha isoform x1*, *alpha-mannosidase 2c1 isoform x2* e *l-lactate dehydrogenase a-like 6b*. Apesar de a metodologia MudPIT não ser determinada como quantitativa, os *spectral counts* podem ser utilizados para descrever semiquantitativamente a abundância proteica (LUNDGREN et al., 2010).

Realizaram-se análises de TargetP, SignalP e TMHMM, com base nas sequências proteicas encontradas. A análise de TargetP prediz a localização subcelular das proteínas, sendo ‘s’ a presença de um peptídeo sinal, típica de vias secretórias e ‘m’ o peptídeo alvo mitocondrial (EMANUELSSON et al., 2000). A análise de SignalP prediz a presença de peptídeo sinal, sendo gerado resultado positivo (yes) ou negativo (no) para peptídeo sinal (PETERSEN et al., 2011). A análise de TMHMM prediz a presença de proteínas transmembrana, sendo gerados resultados como ‘outside’, que significa que a proteína não possui domínio transmembrana e ‘inside, TMhelix’, indicando que a proteína possui domínios transmembrana (KROGH et al., 2001). A listagem das 10 proteínas mais abundantes encontra-se na tabela 3, sendo posteriormente discutida.

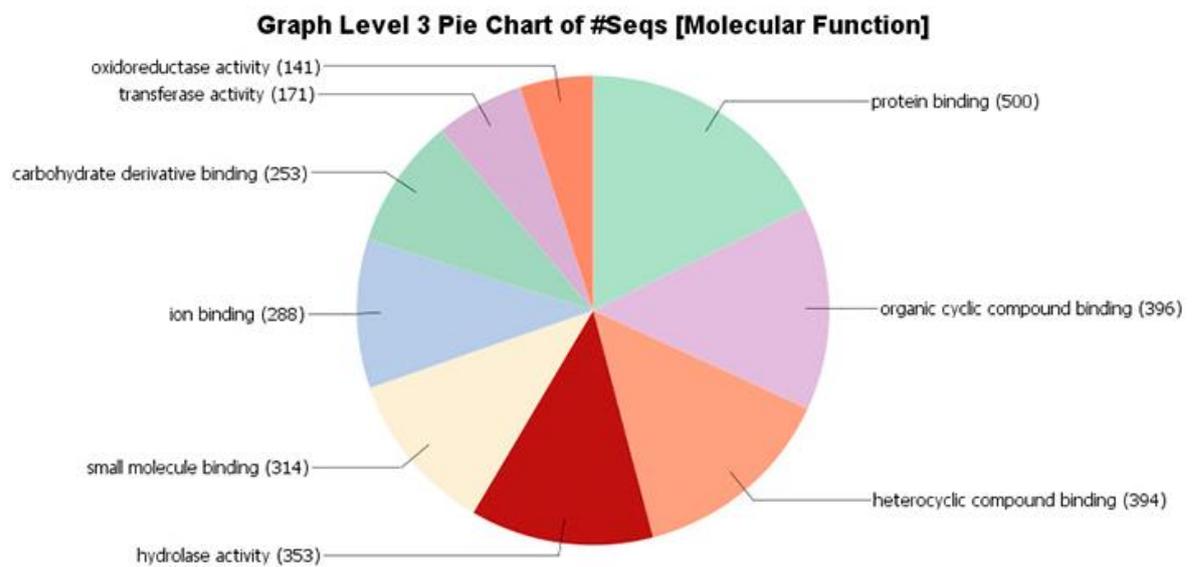
Tabela 3 - Listagem das 10 proteínas mais abundantes encontradas no espermatozoide suíno retirado da cauda do epidídimo. São apresentados dados de quantificação da proteína, bem como termos de ontologia gênica obtidas pelo software Blast2GO e as análises de bioinformática com os programas TargetP, SignalP e TMHMM.

Número de acesso	<i>Spectral counts</i>	Nome da proteína	Comprimento (aa)	TargetP	SignalP	TMHMM
NP_001116600.1	2646	heat shock 70 kda protein 1-like GO: ATP binding; heat shock protein binding; binding of sperm to zona pellucida; ubiquitin protein ligase binding; cell body; blood microparticle; cytosol; unfolded protein binding; COP9 signalosome; protein refolding; zona pellucida receptor complex; positive regulation of protein targeting to mitochondrion	641	-	no	outside
XP_003126581.1	1039	acrosin-binding protein GO: nucleus; zinc ion binding; protein binding; sperm capacitation; acrosomal vesicle; integral component of membrane; extracellular region	539	s	yes	outside
NP_998931.1	820	heat shock 70 kda protein 1b-like GO: ATP binding; cytoplasm	641	-	no	outside
NP_001037992.1	741	beta-enolase isoform x1 GO: magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity; extracellular space; extracellular exosome; glycolytic process; phosphopyruvate hydratase complex; plasma membrane	434	-	no	outside
XP_005652652.1	725	gamma-enolase GO: magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity; gluconeogenesis; extracellular space; myelin sheath; extracellular exosome; protein binding; photoreceptor inner segment; perikaryon; canonical glycolysis; phosphopyruvate hydratase complex; plasma membrane	434	-	no	outside
NP_001156360.1	693	phosphatidylethanolamine-binding protein 4 isoform x1 GO: extracellular exosome	222	s	yes	outside
NP_999271.1	642	zona pellucida-binding protein 1 GO: nucleus; acrosome assembly; binding of sperm to zona pellucida; acrosomal vesicle; cell body; extracellular region; zona pellucida receptor complex	350	m	no	outside
XP_005668767.1	498	leucine-rich repeat-containing protein 37a-like GO: integral component of membrane	2299	s	yes	TMhelix, inside

XP_003123401.1	496	camp-dependent protein kinase catalytic subunit alpha isoform x1	351	-	no	outside	GO: renal water homeostasis; regulation of proteasomal protein catabolic process; activation of protein kinase A activity; epidermal growth factor receptor signaling pathway; fibroblast growth factor receptor signaling pathway; protein autophosphorylation; negative regulation of smoothened signaling pathway involved in dorsal/ventral neural tube patterning; cAMP-dependent protein kinase complex; regulation of insulin secretion; water transport; calcium channel complex; sperm capacitation; regulation of protein binding; cellular response to glucose stimulus; cellular response to glucagon stimulus; cellular response to parathyroid hormone stimulus; cytosol; neuromuscular junction; mesoderm formation; protein kinase binding; gluconeogenesis; positive regulation of protein export from nucleus; negative regulation of meiotic cell cycle process involved in oocyte maturation; germinal vesicle; regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity; regulation of cardiac conduction; neurotrophin TRK receptor signaling pathway; ubiquitin protein ligase binding; modulation of synaptic transmission; triglyceride catabolic process; peptidyl-serine phosphorylation; peptidyl-threonine phosphorylation; nucleotide-activated protein kinase complex; calcium-mediated signaling using intracellular calcium source; blood coagulation; plasma membrane raft; regulation of osteoblast differentiation; nucleoplasm; stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway; ATP binding; extracellular exosome; protein serine/threonine/tyrosine kinase activity; G2/M transition of mitotic cell cycle; sperm midpiece; neural tube closure; cellular response to epinephrine stimulus; ciliary base; positive regulation of cell cycle arrest; regulation of bicellular tight junction assembly; cell communication by electrical coupling involved in cardiac conduction; transmembrane transport; energy reserve metabolic process; regulation of cytosolic calcium ion concentration; cAMP-dependent protein kinase activity; activation of phospholipase C activity; organelle organization; regulation of heart rate; centrosome; innate immune response; mitochondrion; protein kinase A regulatory subunit binding; regulation of cardiac muscle contraction by regulation of the release of sequestered calcium ion; regulation of protein processing
XP_001924224.1	491	alpha-mannosidase 2c1 isoform x2	1040	-	no	outside	GO: protein deglycosylation; alpha-mannosidase activity; zinc ion binding; mannose metabolic process; carbohydrate binding; vacuole
XP_003361852.2	489	l-lactate dehydrogenase a-like 6b	377	m	no	outside	GO: nucleus; carbohydrate metabolic process; L-lactate dehydrogenase activity; mitochondrion; oxidation-reduction process; carboxylic acid metabolic process

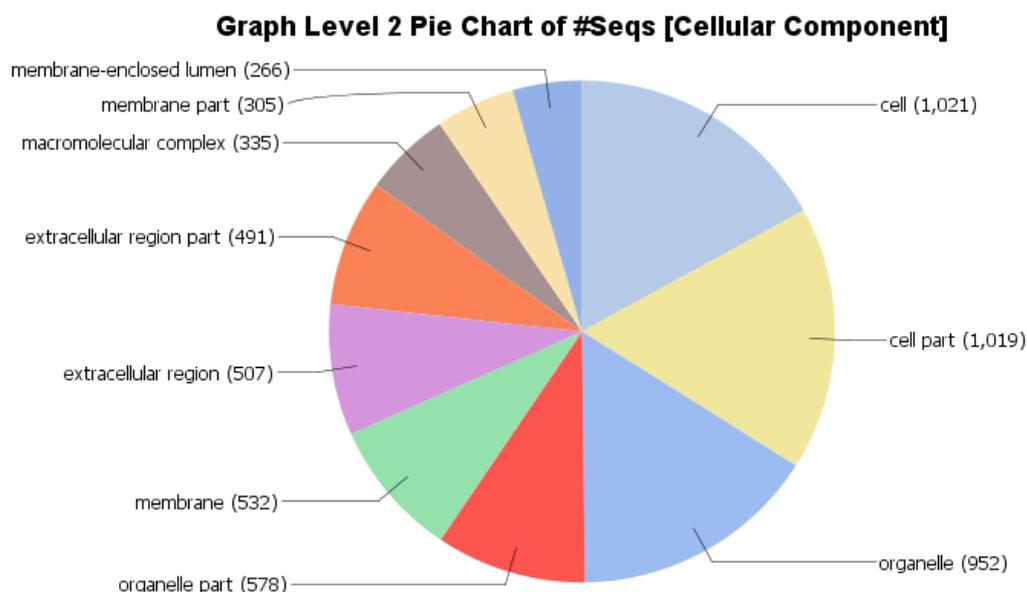
A análise de ontologia gênica resultou na identificação de 1046 proteínas com descrição de função molecular. Dentre elas, 817 estão relacionadas com *binding* e 719 proteínas estão relacionadas com *catalytic activity*, analisando-se em nível secundário. A análise do nível terciário apresenta 500 proteínas relacionadas com *protein binding*, 396 relacionadas com *organic cyclic compound binding* e 394 relacionadas com *heterocyclic compound binding* (figura 4).

Figura 4 – Função molecular das proteínas obtida por análise de ontologia gênica através do software Blast2GO identificadas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo de suínos.



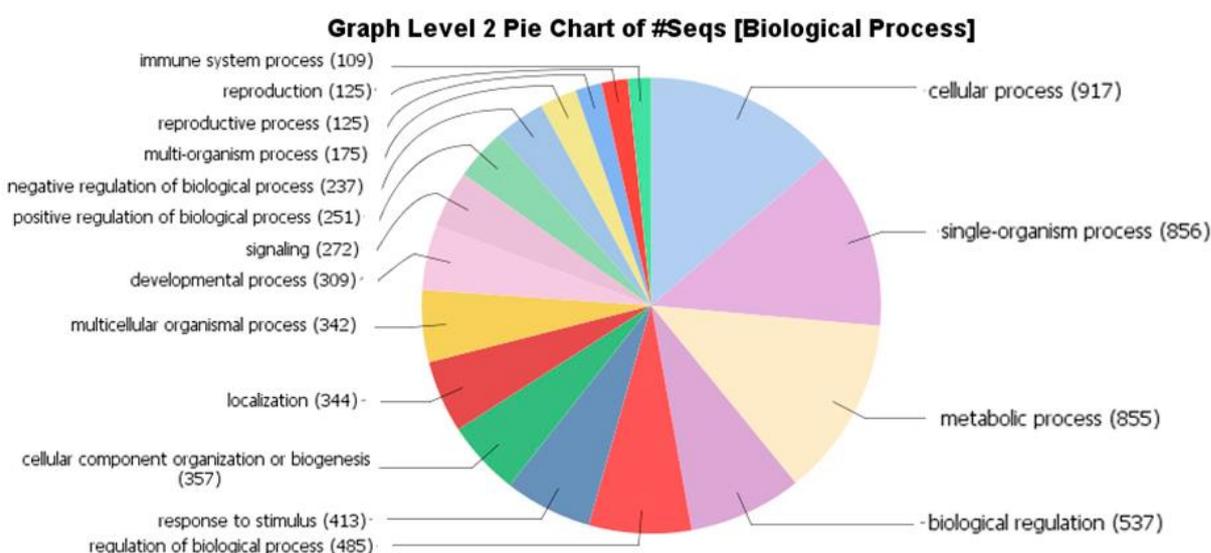
A análise de componente celular identificou 1021 proteínas relacionadas com *cell*, 1019 relacionados com *cell part*, 952 relacionadas com *organele* e 578 relacionadas com *organele part*, conforme disposto na figura 5, além de outras relações com menor proporção, como *membrane*, *extracellular region* e *macromolecular complex*.

Figura 5 – Proteínas relacionadas com componentes celulares obtida por análise de ontologia gênica através do software Blast2GO identificadas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo de suínos.



Ao se analisar o processo biológico envolvido, 917 proteínas apresentaram relação com *cellular process*, 856 com *single-organism process* e 855 com *metabolic process*. Neste tópico cabe ressaltar a presença de 251 proteínas envolvidas com *positive regulation of biological process* e 237 com *negative regulation of biological process*, além de 125 proteínas envolvidas com *reproduction* e *reproductive process*, conforme disposto na figura 6.

Figura 6 – Processos biológicos obtida por análise de ontologia gênica através do software Blast2GO identificadas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo de suínos.



A análise KEGG (GOTZ *et al.*, 2008) gerou 106 mapas de interação com as proteínas descritas. As proteínas identificadas nas vias metabólicas relacionadas com fisiologia espermática estão descritas no apêndice desta dissertação. No Apêndice A estão descritas as proteínas associadas a metabolismo energético da célula, em processos como glicólise, com o metabolismo de frutose e manose e metabolismo de galactose. No apêndice B, estão descritas as proteínas envolvidas com a fosforilação oxidativa, importante função celular associada a produção de ATP para motilidade e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As proteínas descritas pelo KEGG como participantes das vias contendo metabolismo de aminoácidos (metabolismo de alanina, aspartato, glutatona, arginina, cisteína e metionina, e degradação de valina, leucina e isoleucina), estão descritas no apêndice C. No Apêndice D estão descritas as proteínas envolvidas com a biossíntese e degradação de esteroides e hormônios esteroides.

4.2 Regulação hormonal da expressão de β -defensinas no cachaço

Foi identificada a expressão gênica das β -defensinas pBD3, pBD4, pBD125 e pEP2C no testículo e nas três regiões do epidídimo de todos os animais avaliados. Todas as β -defensinas estudadas apresentaram diferença na expressão gênica entre os grupos experimentais em no mínimo uma porção, (pBD125 e pEP2C), tendo a pBD3 e pBD4 apresentado diferenças na expressão gênica em duas porções.

A imunização contra o GnRH alterou a expressão da pBD3 nas porções da cabeça e da cauda do epidídimo. O grupo imunizado apresentou maior expressão na cabeça ($p < 0,01$) e na cauda ($p < 0,01$), se comparado ao grupo controle (Figura 7B). Ainda, a pBD3 apresentou uma maior expressão gênica no corpo do epidídimo em relação as demais regiões avaliadas em ambos os grupos ($p < 0,01$). A redução de testosterona plasmática após a imunocastração teve uma consequência diferente na expressão da pBD4 no testículo e no epidídimo. No testículo (figura 8A), a expressão no grupo imunizado foi maior do que no grupo controle ($p < 0,05$), bem como a expressão no corpo do epidídimo (figura 8B), que foi maior no grupo imunizado do que no grupo controle ($p < 0,05$). Não foi observada diferença na expressão gênica de pBD4 entre as regiões epididimárias. Similarmente a pBD4, a pEP2C apresentou maior expressão gênica no corpo do epidídimo (figura 9B) de animais do grupo Imunocastrado em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 8B), apresentando diferenças entre as regiões epididimárias no grupo

vacinado contra GnRH ($P < 0,05$). A pBD125 teve sua expressão gênica aumentada no grupo imunocastrado apenas na cauda do epidídimo (figura 10 B) ($p < 0,05$), não apresentando diferenças entre os grupos para as demais regiões testadas, nem entre regiões epididimárias.

Figura 7 - Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica da β -defensina suína 3 (pBD3) em testículo e epidídimo de suínos. Valores expressos em média \pm desvio padrão em (A) testículo e (B) cabeça, corpo e cauda do epidídimo em animais do grupo controle (colunas brancas) e imunizado contra o GnRH (colunas pretas). Asterisco acima das colunas indica diferença estatística ($p < 0,01$) entre grupos. As letras nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre as regiões epididimárias.

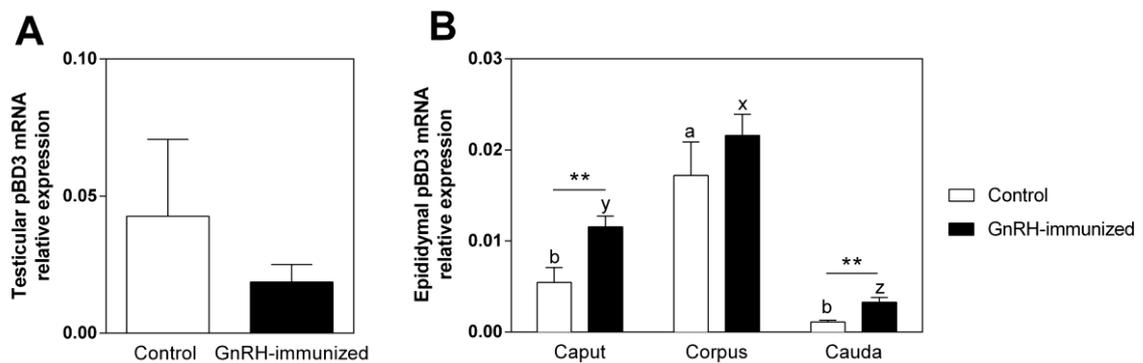


Figura 8. Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica da β -defensina suína 4 (pBD4) em testículo e epidídimo de suínos. Valores expressos em média \pm desvio padrão em (A) testículo e (B) cabeça, corpo e cauda do epidídimo em animais do grupo controle (colunas brancas) e imunizado contra o GnRH (colunas pretas). Asterisco acima das colunas indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos.

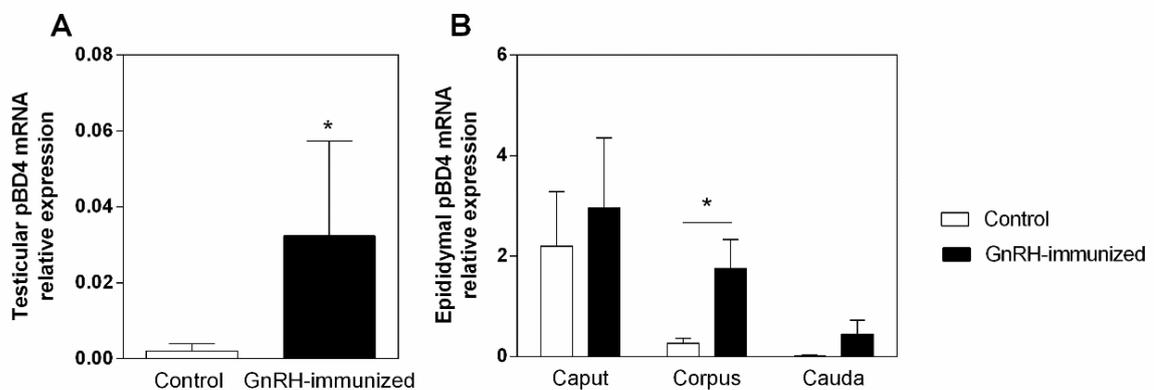


Figura 9 – Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica da proteína epididimária 2C (pEP2C) em testículo e epidídimo de suínos. Valores expressos em média \pm desvio padrão em (A) testículo e (B) cabeça, corpo e cauda do epidídimo em animais do grupo controle (colunas brancas) e imunizado contra o GnRH (colunas pretas). Asterisco acima das colunas indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos. As letras nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre as regiões epididimárias.

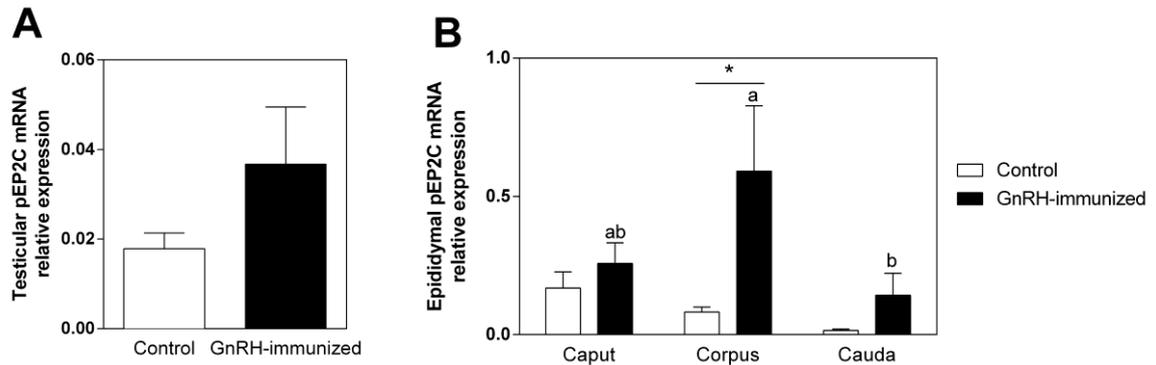
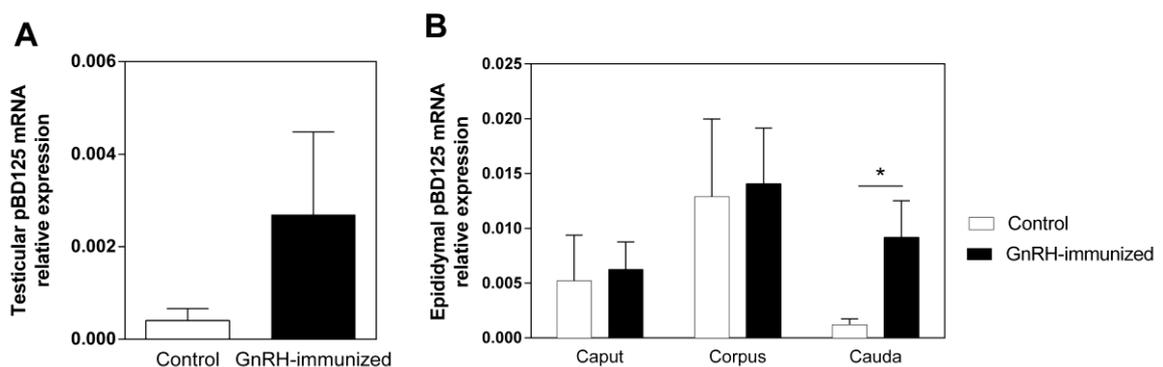


Figura 10 - Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica da β -defensina suína 125 (pBD125) em testículo e epidídimo de suínos. Valores expressos em média \pm desvio padrão em (A) testículo e (B) cabeça, corpo e cauda do epidídimo em animais do grupo controle (colunas brancas) e imunizado contra o GnRH (colunas pretas). Asterisco acima das colunas indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos



5. DISCUSSÃO

Nesta dissertação foram utilizadas duas abordagens biotecnológicas para estudar a maturação epididimária na espécie suína. O epidídimo é um órgão chave na fertilidade masculina e tem ganhado maior atenção nos últimos anos devido ao desenvolvimento de novas ferramentas para estudar sua função a nível molecular. Tais conhecimentos têm permitido desenvolver novas estratégias para o aumento das taxas de fertilidade em diversas espécies de animais de produção e na saúde reprodutiva humana.

5.1 Proteômica do espermatozoide suíno

No primeiro experimento apresentado, a proteômica de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de suínos através da metodologia MudPIT é descrita pela primeira vez. Esta técnica permitiu a identificação de 1681 proteínas associadas com diferentes processos celulares, componentes celulares e funções moleculares. O espermatozoide da cauda do epidídimo está pronto para a ejaculação após a passagem e maturação pelo epidídimo. Nesta fase, o espermatozoide da cauda do epidídimo, juntamente com o plasma seminal e as secreções das glândulas anexas, irão compor o ejaculado. A descrição da composição proteica do espermatozoide retirado da cauda do epidídimo serve para identificar e mapear proteínas específicas, importantes para o metabolismo espermático, concebendo-se assim perspectivas para pesquisas complementares, estudando-se as proteínas individualmente ou em conjunto.

A cauda do epidídimo, porção distal deste órgão, é responsável principalmente pelo armazenamento de espermatozoides. Nas porções iniciais do epidídimo, cabeça e corpo, o espermatozoide sofre uma série de alterações, em decorrência do meio no qual está inserido,

passando de um espermatozoide com pouca capacidade fecundante, para um espermatozoide capacitado, com plenas condições de fertilização (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980). Já na cauda do epidídimo, o espermatozoide está com uma baixa taxa metabólica, possui motilidade progressiva e está apto a ejaculação (DACHEUX *et al.*, 2005). O estudo da composição proteica do espermatozoide retirado da cauda do epidídimo através da metodologia MudPIT auxilia no esclarecimento das alterações proteicas que ocorrem a nível de maturação epididimária.

A composição proteica do espermatozoide retirado da cauda do epidídimo do suíno deve ser analisada de forma qualitativa e quantitativa. A análise quantitativa envolve as 10 proteínas mais abundantes (0,59% das proteínas identificadas), que representam 20,52% das contagens de espectros. Apesar de o maior número de proteínas identificadas apresentarem uma baixa contagem de espectral (62,1% das proteínas apresentaram contagens inferiores a 10 *spectral counts*), faz-se necessária uma análise quantitativa, devido a maior interação destas proteínas mais abundantes com o espermatozoide. A metodologia de MudPIT é tida como semiquantitativa, no entanto a abundância proteica pode ser predita (LUNDGREN *et al.*, 2010). Abaixo serão descritas as 10 proteínas com maior abundância.

A proteína mais abundante no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo do suíno foi a *Heat Shock Protein (HSP) 70 kDa protein 1 like*. Esta proteína atua nas funções de dobramento e tráfico de proteínas, bem como na inibição da agregação proteica e na degradação proteica (DAUGAARD *et al.*, 2007). A presença desta proteína no espermatozoide de suínos (BELLEANNEE *et al.*, 2011) e no oviduto de mamíferos sugere uma relação na manutenção da viabilidade espermática e na fertilização (ELLIOTT *et al.*, 2009). Além disso, esta chaperona, com alta conservação evolucionária, atua na motilidade espermática em estudos *in vitro*, ligando-se a superfície do espermatozoide e participando da migração espermática (HIYAMA *et al.*, 2014). O aumento nos níveis da HSP70 em espermatozoide congelado de suínos é relacionado com maior criotolerância, protegendo o espermatozoide das alterações causadas pelo congelamento. Além disso, com o aumento do tempo de criopreservação, ocorre aumento nos índices de HSP70. A fosforilação de serinas da HSP 70 pode interferir nos processos de ativação e inativação espermática, alterando assim as taxas metabólicas e o estresse oxidativo (YESTE *et al.*, 2014). Recentemente, a HSP70 de testículo do peixe *Boleophthalmus pectinirostris* foi relacionada com estresse calórico, falha na espermatogênese e fertilidade. A diminuição nos níveis da HSP70 em testículo de peixes com estresse calórico leva a alterações no tecido conectivo, comprometendo a função testicular e consequentemente a função reprodutiva. A HSP70, neste caso protege o espermatozoide contra o estresse calórico

(HAN et al., 2016). Além disso, a HSP70 está relacionada com a autofagia e sobrevivência dos gametas no trato reprodutivo feminino (SISTI *et al.*, 2015). A presença e abundância desta proteína no espermatozoide do suíno corrobora com os dados acima citados, visto que atua principalmente nos processos de estresse oxidativo, que ocorrem ao longo do epidídimo durante a maturação espermática.

A *acrosin binding protein* (ACRBP), presente no espermatozoide suíno (BELLEANNEE *et al.*, 2011), está localizada no acrosoma e participa da reação do acrossomo durante a fertilização. Esta etapa é muito complexa e envolve a ativação do acrossomo, ligação e hidrólise da zona pelúcida (MAO e YANG, 2013). As proteínas acrossomais interagem com a zona pelúcida e formam complexos proteicos com alto peso molecular (KONGMANAS et al., 2015) cooperando com a penetração espermática (FERRER et al., 2012). Os níveis da ACRBP podem ser utilizados para o monitoramento da espermatogênese *in vivo* e *in vitro*, bem como marcador molecular espermático e para monitoramentos das funções reprodutivas em ganhos (KIM et al., 2015). Em suínos, a análise da ACRBP e da triosephosphate isomerase após a coleta do sêmen pode prever a congelabilidade, podendo ser usada como monitoramento visando otimizar a função reprodutiva (VILAGRAN et al., 2013). A presença e abundância desta proteína corrobora com a sua importância biológica durante os processos de fertilização.

A proteína *gamma enolase* é a terceira mais abundante neste estudo e a mais abundante entre as proteínas relacionadas com a glicólise. Estes resultados corroboram com Petit e colaboradores (2013) que identificaram a enolase I em humanos, participando da via glicolítica. Em suínos, a alpha enolase foi descrita no espermatozoide (BELLEANNEE *et al.*, 2011), contudo pouco se sabe acerca da sua associação com a fertilidade. Em ratos machos foi observado que defeitos resultantes de um *gene trap* da enolase 4 geram defeitos espermáticos estruturais e infertilidade. Os defeitos, flagelo anormal e peça intermediária incompleta, modificam a morfologia espermática e impactam na motilidade e consequentemente na fertilidade (NAKAMURA *et al.*, 2013). A abundância desta proteína no presente estudo está relacionada com a sua atividade biológica nas vias glicolíticas, essenciais para a manutenção das funções reprodutivas.

A *phosphatidylethanolamine binding protein* está associada com a superfície da membrana plasmática espermática. Durante o trânsito através do epidídimo esta proteína, que é secretada pelo testículo e epidídimo, interage com o espermatozoide alterando as taxas de

motilidade. A incubação de espermatozoides suínos com *phosphatidylethanolamine binding protein 4* promove a motilidade em estudos *in vitro* (AN *et al.*, 2012). O fenômeno de capacitação e decapacitação em camundongos é relacionada com *phosphatidylethanolamine binding protein 1*, visto que ela é associada com alterações na membrana plasmática do espermatozoide na cabeça e flagelo (GIBBONS *et al.*, 2005). Esta proteína, quarta mais abundante neste estudo, está relacionada diretamente com a capacitação espermática, apresentando assim uma importante função biológica.

A *Zona pellucida binding protein* (ZBPB) é uma proteína das espermatídes e do espermatozoide, estando presente no acrossoma, participando da interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida. Mutações na ZBPB em humanos estão relacionadas com morfologia anormal da cabeça do espermatozoide, bem como relacionados com teratozoospermia (YATSENKO *et al.*, 2012). A ZBPB é responsável pelas fases iniciais da reação do acrossoma, pela seleção de espermatozoides capacitados e pela prevenção do polispermia em camundongos (LIN *et al.*, 2007), reações muito importantes no processo de interação entre espermatozoide e oócito (PRIMAKOFF e MYLES, 2002). Os resultados do presente trabalho confirmam os achados do grupo de Dacheux na França, que descreveu a presença desta proteína no espermatozoide suíno (BELLEANNEE *et al.*, 2011).

A *Leucine-rich repeat-containing protein* é uma proteína transmembrana associada com a via de sinalização da proteína G. Recentemente, ela foi descrita como uma proteína moduladora do canal de potássio dependente de voltagem Slo3, que é crítico para a fertilidade (YANG *et al.*, 2011). Além disso, a perda desta proteína afeta o K_{sper} e estabelece uma séria redução na fertilidade (ZENG *et al.*, 2015). O K_{sper} é um canal de K⁺, que altera a carga elétrica da membrana, controlando o potencial da membrana e as suas interações (NAVARRO *et al.*, 2007).

As *Proteins AMP kinase* (AMPK), localizadas no flagelo, estão associadas com a motilidade espermática, visto que uma inibição desta proteína leva a uma potente inibição da motilidade do espermatozoide (AMARAL 2014). Esta proteína, juntamente com o cálcio, modula a via da sinalização, causando um decréscimo na motilidade espermática (TURNER 2006). Em camundongos, a deleção deste gene resulta em infertilidade masculina, sugerindo assim que a motilidade é dependente desta via (SKALHEGG *et al.*, 2002). A *AMP kinase* é expressa em espermatozoide suíno em altas concentrações sob condições fisiológicas, participando ativamente da regulação da motilidade (HURTADO DE LLERA *et al.*, 2012), da

manutenção da qualidade espermática ao longo do tempo (MARTIN-HIDALGO *et al.*, 2013) e da manutenção da organização da membrana plasmática do espermatozoide suíno (HURTADO DE LLERA *et al.*, 2013). Além disso, a AMPK participa da regulação da função espermática, como a viabilidade, potencial de membrana mitocondrial, integridade da membrana acrosomal externa e fluidez da membrana plasmática (HURTADO DE LLERA *et al.*, 2015). Estas considerações corroboram com a importância biológica desta proteína e da sua via biológica, bem como de ativador da AMPK, que por atuar diretamente na via, pode alterar o nível metabólico e alterar as taxas de fertilidade (HURTADO DE LLERA *et al.*, 2015).

A *Alpha-mannosidase* foi descrita em suínos em 1995, pelo grupo de Dacheux, sendo secretada por diferentes porções epididimárias (OKAMURA *et al.*, 1995). Esta proteína é localizada no acrossomo ou integrada na membrana espermática, estando relacionada com a interação entre espermatozoide e oócito (KUNO *et al.*, 2000). Ela também foi identificada em estudo sobre maturação epididimária na superfície do espermatozoide, corroborando com nossos resultados (BELLEANNEE *et al.*, 2011). Em ganhões, esta proteína é relacionada com a aquisição da motilidade e fertilidade, devido a sua interação direta do espermatozoide com a zona pelúcida (RETAMAL *et al.*, 2012).

A *lactate dehydrogenase* é uma enzima que converte lactato a piruvato, participando do metabolismo glicolítico. Esta proteína possui a segunda maior contagem dentre as proteínas relacionadas com a glicólise (apêndice B) e a primeira contagem no metabolismo de aminoácidos (apêndice D). Em suínos, esta proteína foi estudada em 1986, quando seu potencial enzimático foi elucidada no espermatozoide de suínos (EGBUNIKE *et al.*, 1986). Ela é presente na cabeça, peça intermediária e cauda do espermatozoide (KOHSAKA *et al.*, 1992) e está relacionada com a maturação epididimária (BELLEANNEE *et al.*, 2011). Esta proteína possui uma relação próxima com a fertilidade, visto que em camundongos *knockout* da *lactate dehydrogenase*, há relatos de ausência de hiperatividade, inabilidade de penetração na zona pelúcida e falha nos eventos de capacitação (ODET *et al.*, 2008). Além disso, o mesmo grupo descreveu alterações na fosforilação oxidativa e na glicólise em camundongos *knockout*, que na ausência de glicose, utiliza a fosforilação oxidativa para a produção de ATP. Na presença de glicose o espermatozoide obtém energia através da glicólise aeróbica, alterando a via metabólica (ODET *et al.*, 2013). Esta proteína também pode ser utilizada para monitorar a fertilidade de espermatozoides humanos através de uma metodologia coloração histoquímica rápida (CUI *et al.*, 2015). A presença desta proteína no espermatozoide suíno corrobora com a

sua importância biológica, estando presente nas rotas metabólicas da glicólise e do metabolismo de aminoácidos.

A técnica de MudPIT permitiu a identificação de um número de proteínas dezenas de vezes maior do que o já descrito para a mesma amostra. Assim, as ferramentas de bioinformática foram essenciais para a extração de informações dos dados obtidos. A seguir, serão apresentadas as proteínas relacionadas a rotas metabólicas em comum, tanto para a produção de energia, quanto para síntese e processamento de aminoácidos e esteroides.

Metabolismo energético

A atividade catalítica do espermatozoide na cauda do epidídimo corresponde a uma gama de vias metabólicas, incluindo vias relacionadas com motilidade, transferência de energia e sobrevivência. Nesta discussão, focamos nas vias metabólicas que envolvem glicólise, metabolismo de frutose e manose e galactose, oxidação fosforilativa, metabolismo de aminoácidos e metabolismo de esteroides (Apêndices A a D). Estas proteínas participam de uma ou mais vias metabólicas, sendo importantes candidatas a biomarcadores.

O metabolismo energético do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e masculino requer um perfeito sincronismo nas atividades, a fim de que a energia disponível na célula espermática seja suficiente para a realização das funções metabólicas, como motilidade, capacitação, reação do acrossomo e fertilização (DU PLESSIS *et al.*, 2015). O espermatozoide pode utilizar duas vias distintas para suprir sua demanda energética: glicólise e fosforilação oxidativa. A glicólise, fonte primária de energia no espermatozoide, é relacionada principalmente com a capacitação, hiperativação e reação do acrossoma, na cabeça e cauda do espermatozoide. A adição de glicose, ou outro sacarídeo glicolítico em espermatozoides, altera a motilidade e a capacitação (WILLIAMS e FORD, 2001).

As enzimas glicolíticas estão presentes no espermatozoide, regulando a produção de ATP e conseqüentemente, a motilidade espermática (KRISFALUSI *et al.*, 2006). Além disso, a glicólise participa de uma importante relação de transferência energética no espermatozoide, para o movimento flagelar. Este sistema atua como tampão, transferindo energia da produção de ATP na peça intermediária, para os sítios de consumo de ATP, localizados na flagelo do

espermatozoide (TAKEI *et al.*, 2014), assegurando a transferência de energia e o equilíbrio elétrico da reação (DZEJA e TERZIC, 2003).

As proteínas *gamma enolase* e *lactate dehydrogenase* já foram descritas dentre as 10 proteínas mais abundantes, apresentando uma grande importância no metabolismo espermático. Durante o metabolismo energético, várias enzimas atuam em reações metabólicas, interferindo em vias metabólicas como succinato. A enzima *pyruvate kinase catalysis* transfere um grupo fosfato durante a glicólise. A peça intermediária espermática contém isoformas de *pyruvate kinases* (FEIDEN *et al.*, 2008), que são enzimas glicolíticas e transportadoras de íons. A produção local de ATP pela peça intermediária espermática é necessária para o movimento dos flagelos e para a adequada reação do acrossomo (FEIDEN *et al.*, 2007). A presença e localização destas proteínas interferem no metabolismo e consequentemente, nas taxas de fertilidade. Recentemente foi sugerido uma relação destas proteínas com a ligação a zona pelúcida, corroborando com a sua importância na fertilização (PETIT *et al.*, 2013).

A enzima *phosphoglycerate kinase 1* (PGK1) catalisa a transferência de energia do fosfato para o ADP, formando ATP. A enzima PGK1 em testículo somente ocorre apenas nos estágios iniciais da espermatogênese, modificando para PGK2 durante as fases posteriores da espermatogênese (CHEN *et al.*, 2004). Em camundongos, a PGK2 é localizada na peça principal do espermatozoide. Sua expressão ocorre no testículo, apesar do fato de que camundongos *knockdown* de PGK2 apresentam espermatogênese normal, porém com espermatozoides com alterações na motilidade e consequentemente na fertilidade (DANSHINA *et al.*, 2010). Em homens, a *phosphoglycerate kinase 2* é diminuída em homens inférteis comparados com homens férteis (LEGARE *et al.*, 2014). Em suínos, esta enzima foi descrita em 1999, como análoga da proteína humana (ROHRER, 1999) e identificada pelo grupo de Dacheux em proteínas da superfície de espermatozoides imaturos (BELLEANNEE *et al.*, 2011). A presença do alelo AA na PGK2 em suínos da raça Pietrain está associada com maior volume ejaculado do que em suínos com o alelo CC, ao se estudar as variações decorrentes de polimorfismos. Estes resultados auxiliam no entendimento das variáveis que afetam os parâmetros reprodutivos como o volume de ejaculado (CHEN *et al.*, 2004).

A enzima *Phosphoglycerate mutase 1* foi descrita em culturas de células epididimárias de suínos (BASSOLS *et al.*, 2007). A *Phosphoglycerate mutase 2* ocorre no testículo de ratos (BROOKS, 1976), camundongos (FUNDELE *et al.*, 1987) galos e perus (WISHART e

CARVER, 1984). Em espermatozoide de suínos, a phosphoglycerate mutase 2 foi descrita em um estudo de capacitação epididimária (BELLEANNEE *et al.*, 2011).

A proteína *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPD) está presente no espermatozoide humano (MARTINEZ-HEREDIA *et al.*, 2006). Esta proteína está localizada na cabeça e na peça principal do flagelo espermático, com envolvimento na ligação do espermatozoide com o oócito (MARGARYAN *et al.*, 2015). A concentração desta proteína é aumentada em espermatozoides de homens inférteis, se comparado a homens férteis (LEGARE *et al.*, 2014), embora não tenham sido detectadas alterações na expressão gênica de espermatozoides com motilidade afetada se em comparação a espermatozoides com a cinética normal (PAOLI *et al.*, 2016). Existem duas enzimas GAPD em mamíferos, no entanto somente uma é específica para testículo. Esta enzima atua nas vias metabólicas de produção energética, fornecendo energia para a espermatogênese e para a movimentação e motilidade espermática (KURAVSKY *et al.*, 2011). A oxidação desta enzima diminui a motilidade espermática, fazendo com que o espermatozoide se torne menos competente. A oxidação da GAPD pode estar relacionada com a elevação dos níveis de EROs, gerando assim se não controlada, danos no DNA do espermatozoide. A diminuição da motilidade, causada por um aumento nos níveis de EROs, pode ser encarada como um mecanismo protetivo reprodutivo, a fim de que espermatozoides com danos no DNA não efetuem a fertilização (ELKINA *et al.*, 2011).

A capacitação espermática necessita da ativação da enzima *aldose reductase* (KATOH *et al.*, 2014), presente no espermatozoide suíno (BELLEANNEE *et al.*, 2011). Ela participa das vias metabólicas da galactose, frutose e manose. O inibidor da *aldose reductase*, *alrestatin*, inibe a motilidade progressiva na presença de glicose, mas não na presença de frutose. A proteína *aldose reductase* está presente na espermatozoide retirado da cauda do epidídimo, embora não esteja presente nas células germinativas de bovinos e presente em baixa concentração nas células germinativas de suínos (KATOH *et al.*, 2014). Esta proteína é agregada ao espermatozoide durante o transito epididimário, através de epididimossomos (CABALLERO *et al.*, 2010; SULLIVAN e SAEZ, 2013).

Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa, etapa subsequente a glicólise, está principalmente relacionada com a diferenciação, maturação epididimária e motilidade (DU PLESSIS *et al.*, 2015). O

espermatozoide utiliza as vias da fosforilação oxidativa e da glicólise para seu aporte energético (STOREY, 2008). As proteínas citadas no apêndice B, relacionadas com a fosforilação oxidativa, serão discutidas a seguir.

A *protein prune homolog*, juntamente com a *glycogen synthase kinase 3*, está relacionada com a proliferação celular (KOBAYASHI *et al.*, 2006). Esta proteína não possui relação direta com o espermatozoide, embora alterações na *glycogen synthase kinase 3*, que se relaciona com a *protein prune homolog*, localizada na cauda e na porção anterior do espermatozoide de touros, altera a cinética espermática (SOMANATH *et al.*, 2004).

A proteína *succinate dehydrogenase* está relacionada em humanos com EROs e com a ativação de cascatas metabólicas que podem levar o espermatozoide a morte (AITKEN *et al.*, 2012; TOMAR *et al.*, 2012). Em um estudo com homens astenozoospermicos, a *succinate dehydrogenase*, componente da cadeia respiratória, apresenta uma atividade enzimática maior do que em espermatozoides controle (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998). Entretanto, em homens com fertilidade afetada pelo bisfenol, a *succinate dehydrogenase* é aumentada, juntamente com outras proteínas com a *peroxiredoxis*, *glutathione peroxidase*, *glyceraldehyde 3 phosphate* (RAHMAN *et al.*, 2015).

A *V-type próton ATPase* é secretada pelas células claras do epidídimo (PIETREMENT *et al.*, 2006), possuindo função de manutenção do baixo pH no fluido epididimário luminal, condição esta essencial para a maturação e para o estoque espermático. Várias isoformas desta proteína já foram descritas, atuando em uma ampla gama de processos biológicos, como na reprodução, no diabetes e no câncer (PIETREMENT *et al.*, 2006; TOEI *et al.*, 2010). A atividade da *v-type próton ATPase* foi estudada em espermatozoide de coelhos e com a adição de bafilomicina, um inibidor específico desta proteína, o espermatozoide apresenta uma diminuição nos níveis de capacitação, juntamente com o pH (GARCIA-MACEDO *et al.*, 2001).

A proteína *Cytochrome c oxidase subunit III*, localizada na mitocôndria espermática, participa da fosforilação oxidativa através da cadeia de transporte de elétrons. A atividade enzimática em homens astenozoospermicos é menor do que em homens com espermatozoides normais (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998). Em humanos existem 13 subunidades da *cytochrome c oxidase*, sendo a I, II e III as maiores. A deleção de 15 pares de base da *cytochrome c oxidase III* em humanos é relacionada com infertilidade (MUGHAL *et al.*, 2016).

A *NADH dehydrogenase* é uma enzima que atua na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, no sítio I. Em homens com espermatozoides astenozoospermicos, esta enzima possui maior atividade (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998). Em camundongos, esta proteína participa da fosforilação da tirosina, processo essencial para a capacitação espermática (ARCELAY *et al.*, 2008). Em suínos, ocorre maior abundância desta proteína em leitegadas com menor tamanho (KWON *et al.*, 2015).

As vias metabólicas energéticas espermáticas variam de acordo com as condições espermáticas e com os substratos disponíveis. As vias glicolíticas são preferenciais durante a hiperativação, embora a fosforilação oxidativa possua importância nesta fase (DU PLESSIS *et al.*, 2015). O conhecimento das vias metabólicas permite a identificação de proteínas importantes para as vias, que podem futuramente ser estudadas, buscando-se compreender melhor o papel de cada proteína no metabolismo espermático.

Metabolismo de aminoácidos

A presença de diversas proteínas associadas ao metabolismo de aminoácidos (Apêndice C) chama a atenção uma vez que estas rotas metabólicas não são comumente estudadas no espermatozoide. Estas proteínas identificadas no mapeamento do módulo KEGG serão discutidas a seguir.

A proteína *malate cytoplasmatic* está presente na peça intermediária do espermatozoide suínos (KOHSAKA *et al.*, 1992). Esta enzima altera a oxidação do NADH, o consumo de piruvato e a atividade descarboxilase do piruvato. Além disso, o metabolismo do piruvato pode ser afetado por este sistema, que envolve também a proteína *lactate dehydrogenase* (GEREZ DE BURGOS *et al.*, 1994). Em espermatozoides bovinos, a *malate dehydrogenase* participa da capacitação espermática e da reação do acrossoma (CORDOBA *et al.*, 2005).

A *betaine-homocysteine s-methyltransferase 1*, identificada no fígado e nos rins de suínos, possui relação com a conversão da betaina e homocisteína para dimetilglicina e metionina, respectivamente (GARROW, 1996). A adição de betaine em dietas de suínos aumenta a produção espermática total (CABEZON *et al.*, 2016), enquanto a adição de betaine a dieta de matrizes aumentou o peso das leitegadas de matrizes com elevada ordem de parição (VAN WETTERE *et al.*, 2012). Estes resultados podem ser explicados através da relação desta

proteína com a metionina, a qual é necessária para a adequada função espermática (LEE *et al.*, 1998).

A enzima *L-amino-acid oxidase isoform*, em garanhões, atua como produtora de espécies reativas de oxigênio. Sua atividade enzimática é relacionada com aminoácidos aromáticos, estando elevada em casos de perda de vitalidade (AITKEN *et al.*, 2015). No espermatozoide humano, esta proteína está localizada na peça intermediária e relacionada com a fosforilação da tirosina e com a capacitação. Ela é produtora de ROS, com o nível máximo de atividade quando relacionada com aminoácidos como triptofano e fenilalanina (HOUSTON *et al.*, 2015). Em suínos, esta proteína possui relação com tamanho reduzido das leitegadas (KWON *et al.*, 2015).

A *dihydrolipoyl mitochondrial*, também conhecida por *dihydrolipoamide*, é uma proteína relacionada com o piruvato e lactato, durante a hiperativação e reação acrossomal em espermatozoides de hamster (MITRA e SHIVAJI, 2004), sendo encontrada no acrossomo e na peça principal de espermatozoides (MITRA *et al.*, 2005). Através da inibição do complexo da piruvato desidrogenase e da *dihydrolipoamide dehydrogenase*, o metabolismo do lactato e piruvato é afetado e o espermatozoide de hamster perde a capacidade de fertilização (SIVA *et al.*, 2014). Observa-se assim que, mesmo não tão estudadas, as enzimas associadas a rotas de metabolismo de aminoácidos apresentam significativa importância na fisiologia espermática, podendo estar relacionadas a qualidade do ejaculado.

Metabolismo de esteroides e epidídimo

O papel dos hormônios esteroides no epidídimo é bem estabelecido, não só pela testosterona, mas também pelos estrógenos. (HESS *et al.*, 2011; JOSEPH *et al.*, 2011). A análise KEGG identificou proteínas associadas ao metabolismo de esteroides (Apêndice D), entre elas a aldose reductase, que já foi citada anteriormente. As demais proteínas com maiores *spectral counts* são descritas a seguir.

Presente no espermatozoide da cauda do epidídimo, a *3-hydroxyacyl- dehydrogenase type-2* é análoga a *Mitochondrial dimeric L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*, sendo também identificada no coração de suínos, participando da catalise de isômeros da coenzima A (NOYES e BRADSHAW, 1973). A proteína *human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase* participa do metabolismo de andrógenos, convertendo androstenona para

dihidrotestosterona. Esta proteína é expressa em testículo e próstata, demonstrando assim que o sítio de ação está vinculado a órgãos do sistema reprodutivo (HE et al., 2000).

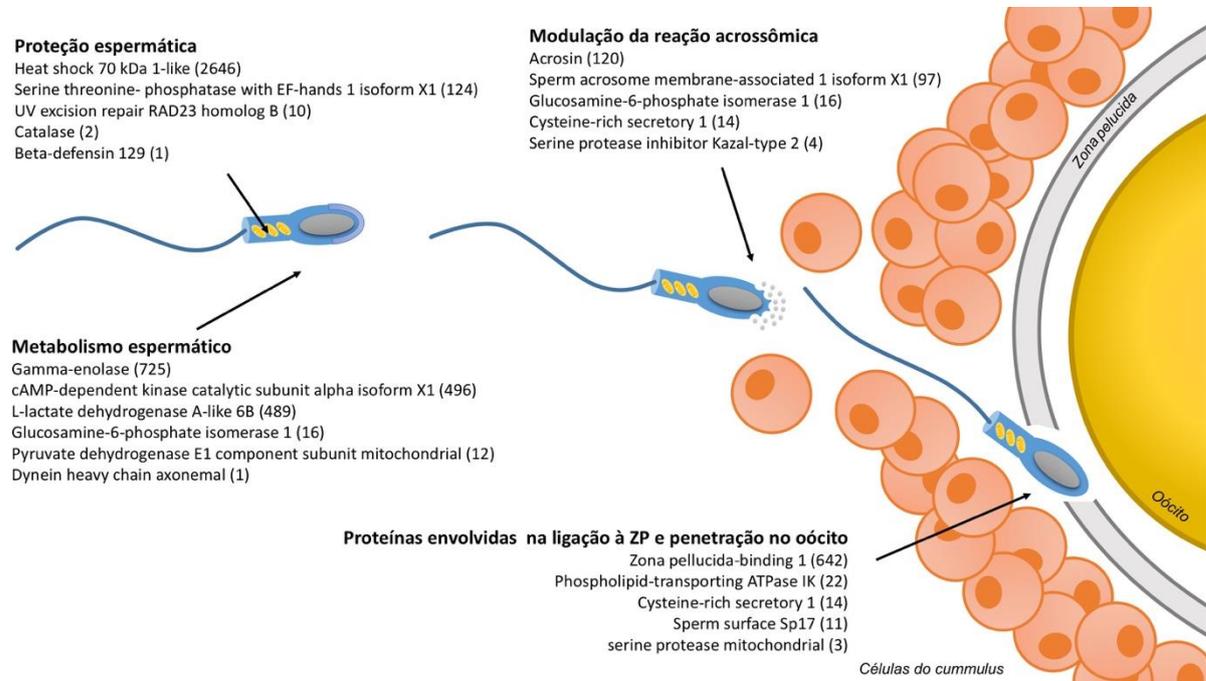
A proteína *dehydrogenase reductase sdr family member 4 isoform x1* é uma proteína relacionada com processos oxidativos, encontrada em testículo de coelhos (USAMI et al., 2003). Em espermatozoide de hamster, esta proteína está localizada exclusivamente na porção mitocondrial do flagelo (NAGDAS et al., 2006).

A *sterol-4-alpha-carboxylate 3- decarboxylating* é uma enzima que catalisa a conversão de beta hidroxisteroides e cetoesteroides. Em humanos, esta proteína atua na biossíntese de colesterol e no transporte de gotículas lipídicas (CALDAS e HERMAN, 2003).

A *lysosomal acid lipase cholesteryl ester hydrolase* é uma proteína citosólica presente no testículo e epidídimo de camundongos, provendo colesterol e ácidos graxos para as células. Em camundongos *knockout* para este gene, a espermatogênese é afetada, com apresentação de anomalias nos túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos apresentam-se mais afetados com o decorrer do tempo além de apresentar um menor peso e tamanho, se comparados aos camundongos controle. O espermatócrito e as taxas de motilidade também são menores no grupo *knockout*. Além disso, a utilização de um gene transgênico nos camundongos *knockout* resultou em melhores condições se comparado aos do grupo *knockout* (HERMO et al., 2008).

A composição do proteoma do espermatozoide obtido da cauda do epidídimo analisada por *shotgun proteomics* evidencia a complexidade desta célula, reflexo de um intrigado processo de diferenciação durante a espermatogênese testicular e maturação epididimária. A figura 11 aponta algumas proteínas já conhecidas por seus papéis na fisiologia espermática e apresenta novas proteínas até então não descritas no espermatozoide suíno. Diversas destas proteínas poderão ser alvo de estudos aprofundados para verificar a possível utilização destas como marcadores celulares para qualidade seminal ou outros parâmetros reprodutivos de interesse.

Figura 11- Descrição de algumas proteínas envolvidas com diferentes processos fisiológicos associadas a função e viabilidade do espermatozoide. A categorização foi baseada na ontologia gênica e revisão bibliográfica das proteínas citadas.



5.2 Regulação androgênica da expressão de β -defensinas em testículo e epidídimo de suínos.

Nesta dissertação demonstrou-se o primeiro estudo referente a regulação androgênica de β -defensinas em epidídimo de suínos. Através da qPCR notou-se que a imunização de suínos contra o GnRH modificou a expressão de β -defensinas, tanto em testículo quanto em epidídimo. Estudos anteriores do grupo de pesquisa descreveram as alterações decorrentes da imunização contra o GnRH na expressão de proteínas chaperonas em testículo e epidídimo, utilizando o mesmo modelo animal (SCHORR-LENZ *et al.*, 2016). Os nossos resultados sugerem que a elevação da expressão gênica de β -defensinas em animais imunizados contra o GnRH é um processo fisiológico em resposta a privação androgênica. Através de alterações na expressão gênica espera-se que ocorra um aumento da produção das β -defensinas, alterando assim a proteômica tecidual. Cabe ainda neste tópico reforçar a função das β -defensinas, que atuam na imunidade local e nos fenômenos de proteção e maturação do espermatozoide, sendo

o aumento da expressão gênica um mecanismo decorrente das condições desfavoráveis para a produção e maturação espermática em suínos imunizados contra o GnRH.

A reprodução nos machos depende dos andrógenos para a adequada manutenção das funções reprodutivas, tais como espermatogênese e maturação epididimária (DOHLE *et al.*, 2003). A privação de andrógenos, temporária ou permanentemente, afeta a fisiologia reprodutiva, como a droga anti-andrôgena flutamida (MUKHERJEE *et al.*, 1992). Ratos pré-púberes expostos a drogas anti androgênicas apresentam uma aceleração do trânsito espermático através do epidídimo, formando assim espermatozoides com motilidade e armazenamento comprometidos (PEROBELLI *et al.*, 2012). A imunização de suínos contra o GnRH, conforme indicações do desenvolvedor do fármaco, promove a diminuição dos níveis de testosterona, chegando a níveis basais, semelhantes aos encontrados em leitoas (DUNSHEA *et al.*, 2001). No suíno imunocastrado são encontrados somente 5% de espermatozoides com morfologia normal e cerca de 78% de espermatozoides imaturos com gota citoplasmática proximal (EINARSSON *et al.*, 2011), demonstrando haver assim alteração na espermatogênese, mas com manutenção de células espermáticas.

Além disso, o diâmetro dos túbulos seminíferos, o peso e o tamanho testicular são diminuídos após a imunização contra o GnRH. No período de 12 semanas após a imunização, a concentração de testosterona é menor nos suínos imunizados contra o GnRH e não se observam espermatozoides com motilidade progressiva, fato este que corrobora com a situação fisiológica afetada da espermatogênese (LI *et al.*, 2015). Este modelo animal, imunizado contra o GnRH, pode ser utilizado na pesquisa básica para mimetizar o hipogonadismo em humanos, devido a similaridade fisiológica desta patologia com o modelo animal suíno imunizado e a semelhança anatômica e fisiológica entre humanos e suínos (SWINDLE *et al.*, 2012).

A maturação espermática depende de uma série de processos metabólicos que ocorrem no decorrer do trânsito epididimário, transformando um espermatozoide não capacitado, com pouca capacidade fertilizante, em um espermatozoide capacitado, com boa capacidade fertilizante (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980). Durante o trânsito epididimário, várias proteínas são secretadas e absorvidas pelas células epididimárias, criando assim um microambiente muito especializado, com um particular transcriptoma, proteoma e secretoma. A maioria das proteínas possui diferença no seu secretoma ao decorrer das regiões epididimárias, variando conforme o local e sua função fisiológica (DACHEUX *et al.*, 2005). Em homens, o perfil de expressão das defensinas foi estudado e a expressão regionalizada foi confirmada,

corroborando com os resultados dos nossos estudos, conforme Figuras 7 a 10. O corpo do epidídimo, apresenta-se na maior parte das vezes, como a porção epididimária com maior expressão das defensinas, fato este relacionado a maior taxa metabólica nesta porção (THIMON *et al.*, 2007).

Em suínos, este é o primeiro relato de quantificação da expressão da pBD3 em epidídimo. No grupo controle, a porção do corpo epididimário apresentou maior expressão do que a cabeça e a cauda do epidídimo, enquanto no grupo imunocastrado, a porção do corpo apresentou maior expressão do que a cabeça e cauda, bem como a porção da cabeça do epidídimo apresentou maior expressão do que na cauda. As publicações de Sang e Choi descrevem haver expressão desta defensina, mas não quantificam a expressão (SANG *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2012). A publicação de Qi quantifica a expressão, porém não possui comparação entre as porções epididimárias (QI *et al.*, 2009). A maior expressão da pBD3 no corpo do epidídimo, tanto no grupo controle como no imunocastrado, está relacionada com as altas taxas metabólicas. Contudo, em humanos, a expressão da defensina 103a, apresenta uma expressão constante, em se tratando das porções epididimárias (THIMON *et al.*, 2007; BELLEANNEE *et al.*, 2012).

Nas porções da cabeça e da cauda do epidídimo do grupo imunizado, a expressão da pBD3 foi maior do que no grupo controle (figura 7B). Com a imunização contra o GnRH e consequentemente a privação androgênica, o aumento da expressão da pBD3 pode ser explicado pela necessidade de manutenção das funções reprodutivas. Baseado na função fisiológica de defesa e maturação espermática, nos suínos imunizados ocorre um aumento compensatório na expressão da pBD3, no intuito de fornecer melhores condições, mesmo que com a privação androgênica, de maturação e proteção espermática no epidídimo. Além disso, com a involução em peso e tamanho do testículo e epidídimo após a imunização contra o GnRH, ocorre um remodelamento da expressão gênica, fato este comprovado por Schorr-Lenz e colaboradores, estudando proteínas chaperonas. Após a imunização contra o GnRH, ocorre uma variação nos níveis de expressão das proteínas chaperonas PDIA3 e PDI, indicando haver uma expressão andrógeno dependente. Cada chaperona reage de forma diferente a imunização contra o GnRH, aumentando ou diminuindo sua expressão, bem como há variação entre as porções estudadas, indicando assim que fatores intrínsecos e luminiais também interferem na expressão (SCHORR-LENZ *et al.*, 2016). A pBD3, bem como as demais β -defensinas, surgem como importantes mediadoras da imunidade local epididimária, alterando a expressão em detrimento da privação androgênica.

O aumento da expressão da pBD4 (figura 8B) e da pEP2C (figura 9B) no corpo do epidídimo corrobora com os dados obtidos da expressão da pBD3, indicando que a imunização contra o GnRH provoca aumento da expressão gênica destas defensinas no corpo epididimário. Além disso, a pBD4 apresentou maior expressão no testículo do grupo imunizado (figura 8A), demonstrando que a expressão desta defensina é andrógeno dependente neste tecido. Nossos resultados não indicaram alteração na expressão entre as porções epididimárias, mas indicaram que a imunização contra o GnRH altera a expressão da pBD125 (figura 10B) na cauda do epidídimo, resultado semelhante ao encontrado para as outras defensinas deste estudo.

De modo análogo a pBD3, os resultados ora apresentados sugerem que o aumento da expressão esteja envolvido com o mecanismo de compensação em detrimento das condições luminais testiculares. Além disso, a expressão das β -defensinas em testículo e epidídimo depende de fatores genômicos e não genômicos, tais como os estrógenos e os fluidos testiculares (JOSEPH *et al.*, 2011). A utilização de tecidos de suínos com 2 meses de privação androgênica difere dos estudos em outros modelos, conforme disposto na tabela 1. A remodelação da expressão gênica de β -defensinas encontrada em outros modelos animais indica haver um decréscimo na expressão das defensinas nos animais com privação androgênica, porém como se observa na figura 1, estes experimentos utilizam animais com uma recente privação androgênica (PUJANTO *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2014), diferindo do modelo animal utilizado nesta pesquisa, o qual possui 2 meses de privação androgênica.

Em ratos a expressão genica da EP2 foi menor em animais castrados se comparado aos animais controle. Estes dados divergem dos nossos resultados, indicando que a EP2 depende de andrógenos para a sua expressão (IBRAHIM *et al.*, 2001), bem como a independência de andrógenos e de fatores testicular para a expressão da SPAG11B em epidídimo de camundongos. Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que o modelo animal utilizado em nossa pesquisa, suínos imunizados contra o GnRH, preserva a estrutura testicular, permitindo assim que fatores luminais e testiculares possam alterar a expressão gênica, fato este que não é possível de ser avaliado ao se utilizar modelos animais castrados.

6. CONCLUSÃO

A presente dissertação demonstra, em dois experimentos, fatores relacionados com a maturação epididimária. No experimento I, o perfil proteômico do espermatozoide retirado da cauda do epidídimo foi estudado, obtendo-se como resultado 1681 proteínas. No experimento II, a expressão de β -defensinas foi estudada em testículo e epidídimo de suínos imunizados contra o GnRH, obtendo-se como resultado que a expressão gênica nos suínos imunizados é maior, em algumas porções epididimárias e testiculares, do que nos animais controle.

A ampla gama de proteínas identificadas no estudo proteômico demonstra a complexidade estrutural dos espermatozoides após a passagem pelo epidídimo. O estudo das vias metabólicas e das interações entre as proteínas, através de ferramentas de bioinformática, permite a visualização da complexidade dos processos de interação espermática, envolvendo as proteínas. A metodologia MudPIT, utilizada neste estudo, permite a identificação das proteínas mais abundantes no espermatozoide e, através de análises de bioinformática permite estabelecer relações entre os componentes celulares, processos biológicos, funções moleculares e vias metabólicas. A presente pesquisa, por possuir um caráter descritivo, fornece dados para pesquisas aplicadas, com identificação de proteínas importantes para a reprodução e maturação epididimária, que podem ser individualmente estudadas.

A expressão das β -defensinas em testículo e epidídimo de suínos demonstra a presença destas proteínas no testículo e epidídimo de suínos. As β -defensinas, conhecidas pela sua importância antimicrobiana e imunitária, também estão relacionadas com aspectos reprodutivos, como a maturação espermática e a manutenção das condições luminais epididimárias adequadas. O entendimento da função das β -defensinas, bem como a descrição das β -defensinas nas diferentes porções epididimárias, é essencial para uma adequada descrição dos fenômenos de maturação espermática epididimária. A maior expressão das β -defensinas

em suínos imunizados contra o GnRH sugere que estas proteínas são responsivas a andrógenos. Nos suínos imunizados ocorreu uma maior expressão em algumas porções epididimárias e testiculares, demonstrando que a expressão varia entre as porções, provavelmente em detrimento da regionalização específica de cada β -defensina.

A utilização dos dados obtidos nestes experimentos possibilita o desenvolvimento de biotecnologias que possam auxiliar na reprodução. A identificação das proteínas identificadas no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo pode auxiliar na identificação de biomarcadores de maturação epididimária, que possam ser aplicados em doses de sêmen, para prover um diagnóstico rápido e preciso das condições espermáticas. A adição de proteínas como as β -defensinas em doses de sêmen surge como alternativa futura para a diminuição da utilização de inibidores microbianos, aumento do tempo de validade e melhora dos índices reprodutivos.

REFERÊNCIAS

ABCS. **Produção de suínos: teoria e prática**. Brasília - DF: Gráfica Qualidade 2014. 908 p.

ABPA. Relatório Anual 2016. 2016. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016> >.

ACSURS. Rebanho Suíno. Estrela - RS, 2015. Disponível em: < <http://www.acsurs.com.br/suinocultura/rebanho-suino/> >. Acesso em: 23/08.

AITKEN, J. B. et al. Characterization of an L-amino acid oxidase in equine spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 92, n. 5, p. 125, May 2015.

AITKEN, R. J. et al. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 39, p. 33048-60, Sep 21 2012.

AN, L. P. et al. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 423, n. 4, p. 690-6, Jul 13 2012.

ARCELAY, E. et al. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. **The International journal of developmental biology**, v. 52, n. 5-6, p. 463-72, 2008.

ARRIGHI, S. Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, n. 8, p. 1061-71, Oct 2014.

AVELLAR, M. C. et al. Differential expression and antibacterial activity of epididymis protein 2 isoforms in the male reproductive tract of human and rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1453-60, Nov 2004.

BAKER, M. A. Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. **Cell and tissue research**, v. 363, n. 1, p. 279-87, Jan 2016.

BAKER, M. A. et al. The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. **Proteomics**, v. 8, n. 11, p. 2312-21, Jun 2008.

BAKER, M. A. et al. Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. **Proteomics. Clinical applications**, v. 1, n. 5, p. 524-32, May 2007.

BASSOLS, J. et al. Proteomic study of the establishment of boar epididymal cell cultures. **Theriogenology**, v. 68, n. 1, p. 76-86, Jul 1 2007.

BAUER, A. et al. Effects of immunization against GnRH on gonadotropins, the GH-IGF-I-axis and metabolic parameters in barrows. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 2, n. 8, p. 1215-22, Aug 2008.

BELLEANNEE, C. et al. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1952-64, May 2011.

BELLEANNEE, C.; THIMON, V.; SULLIVAN, R. Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 3, p. 717-31, Sep 2012.

BIANCO, S. D.; KAISER, U. B. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 10, p. 569-76, Oct 2009.

BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annual review of immunology**, v. 13, p. 61-92, 1995.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of internal medicine**, v. 254, n. 3, p. 197-215, Sep 2003.

BOVINE GENOME, S. et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 522-8, Apr 24 2009.

BRASIL. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. 2008.

BRASIL. Indicadores IBGE - Estatística da produção pecuária - Setembro 2016. p. 45, 2016.

BROOKS, D. E. Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. **The Biochemical journal**, v. 156, n. 3, p. 527-37, Jun 15 1976.

CABALLERO, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. **Veterinary medicine international**, v. 2011, p. 757194, 2010.

CABEZON, F. A. et al. Effect of natural betaine on estimates of semen quality in mature AI boars during summer heat stress. **Animal reproduction science**, v. 170, p. 25-37, Jul 2016.

CALDAS, H.; HERMAN, G. E. NSDHL, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the Golgi and accumulates on ER membranes and on the surface of lipid droplets. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 22, p. 2981-91, Nov 15 2003.

CHEN, J. et al. Different messenger RNA expression for the antimicrobial peptides beta-defensins between Meishan and crossbred pigs. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 3, p. 1633-9, Mar 2010.

CHEN, K. et al. Molecular characterization of the porcine testis-specific phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) gene and its association with male fertility. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 15, n. 12, p. 996-1006, Dec 2004.

CHENG, C. et al. Comparison of gene expression of Toll-like receptors and antimicrobial peptides in immune organs and tissues between Yorkshire and Tibetan pigs. **Animal genetics**, v. 46, n. 3, p. 272-279, Jun 2015.

CHENG, C. Y. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Landes Bioscience, 2008. 289 p.

CHENG, C. Y.; MRUK, D. D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 1, p. 16-64, Jan 2012.

CHOI, M. K. et al. Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine ss-defensin genes. **BMC genetics**, v. 13, p. 98, 2012.

COLLEDGE, W. H. Defending sperm function. **PLoS genetics**, v. 9, n. 10, p. e1003889, Oct 2013.

CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-6, Sep 15 2005.

CONLON, J. M. et al. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. **Peptides**, v. 57, p. 67-77, Jul 2014.

CORDOBA, M.; PINTOS, L.; BECONI, M. T. Differential activities of malate and isocitrate NAD(P)-dependent dehydrogenases are involved in the induction of capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 37, n. 1, p. 40-6, Feb 2005.

COWAN, A. E.; MYLES, D. G. Biogenesis of surface domains during spermiogenesis in the guinea pig. **Developmental biology**, v. 155, n. 1, p. 124-33, Jan 1993.

CUI, Z. et al. Quick histochemical staining method for measuring lactate dehydrogenase C4 activity in human spermatozoa. **Acta histochemica**, v. 117, n. 3, p. 235-42, Apr 2015.

DACHEUX, J. L. et al. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 36-42, May 16 2006.

DACHEUX, J. L. et al. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 58, n. 4, p. 197-210, Aug 2012.

DACHEUX, J. L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 319-41, Jan 15 2005.

DACHEUX, J. L.; PAQUIGNON, M. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. **Reproduction, nutrition, development**, v. 20, n. 4A, p. 1085-99, 1980.

DANSHINA, P. V. et al. Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and male fertility in mice. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 1, p. 136-45, Jan 2010.

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JAATTELA, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS letters**, v. 581, n. 19, p. 3702-10, Jul 31 2007.

DOHLE, G. R.; SMIT, M.; WEBER, R. F. Androgens and male fertility. **World journal of urology**, v. 21, n. 5, p. 341-5, Nov 2003.

DORIN, J. R. Novel phenotype of mouse spermatozoa following deletion of nine beta-defensin genes. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 5, p. 716-9, Sep-Oct 2015.

DORUS, S.; SKERGET, S.; KARR, T. L. Proteomic discovery of diverse immunity molecules in mammalian spermatozoa. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 58, n. 4, p. 218-28, Aug 2012.

DU PLESSIS, S. S. et al. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 2, p. 230-5, Mar-Apr 2015.

DUNSHEA, F. R. et al. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. **Journal of animal science**, v. 79, n. 10, p. 2524-35, Oct 2001.

DZEJA, P. P.; TERZIC, A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. **The Journal of experimental biology**, v. 206, n. Pt 12, p. 2039-47, Jun 2003.

EGBUNIKE, G. N. et al. Changes in porcine sperm lactate dehydrogenase isoenzymes during sperm maturation. **Andrologia**, v. 18, n. 1, p. 108-13, Jan-Feb 1986.

EINARSSON, S. et al. Effects of early vaccination with Improvac((R)) on the development and function of reproductive organs of male pigs. **Animal reproduction science**, v. 127, n. 1-2, p. 50-5, Aug 2011.

ELAHI, S. et al. The host defense peptide beta-defensin 1 confers protection against Bordetella pertussis in newborn piglets. **Infection and immunity**, v. 74, n. 4, p. 2338-52, Apr 2006.

ELKINA, Y. L. et al. Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases sperm motility. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 76, n. 2, p. 268-72, Feb 2011.

ELLIOTT, R. M. et al. Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. **Reproduction**, v. 137, n. 2, p. 191-203, Feb 2009.

EMANUELSSON, O. et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of molecular biology**, v. 300, n. 4, p. 1005-16, Jul 21 2000.

FEI, Z. et al. mBin1b transgenic mice show enhanced resistance to epididymal infection by bacteria challenge. **Genes and immunity**, v. 13, n. 6, p. 445-51, Sep 2012.

FEIDEN, S. et al. A novel pyruvate kinase (PK-S) from boar spermatozoa is localized at the fibrous sheath and the acrosome. **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 81-95, Jul 2007.

FEIDEN, S. et al. Expression and compartmentalisation of the glycolytic enzymes GAPDH and pyruvate kinase in boar spermatogenesis. **Reproduction, fertility, and development**, v. 20, n. 6, p. 713-23, 2008.

FERRER, M. et al. MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 3, p. 881-95, Sep 2012.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 1, p. 37-51, Jan 2012.

FODE, P.; STEGGER, M.; ANDERSEN, P. S. Human beta-defensin 3 (DEFB103) and its influence on Staphylococcus aureus nasal carriage. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. e388-94, Jun 2011.

FRANCA, L. R. et al. Blood-tissue barriers: morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 763, p. 237-59, 2012.

FROHLICH, O.; PO, C.; YOUNG, L. G. Organization of the human gene encoding the epididymis-specific EP2 protein variants and its relationship to defensin genes. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 4, p. 1072-9, Apr 2001.

FUNDELE, R. et al. Developmental activation of phosphoglycerate mutase-2 in the testis of the mouse. **Developmental biology**, v. 124, n. 2, p. 562-6, Dec 1987.

GANZ, T. Defensins and host defense. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 420-1, Oct 15 1999.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 9, p. 710-20, Sep 2003.

GARCIA-MACEDO, R. et al. Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa. **Andrologia**, v. 33, n. 2, p. 113-21, Mar 2001.

GARROW, T. A. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 37, p. 22831-8, Sep 13 1996.

GEREZ DE BURGOS, N. M. et al. Effect of L-malate on pyruvate dehydrogenase activity of spermatozoa. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 308, n. 2, p. 520-4, Feb 1 1994.

GIBBONS, R.; ADEOYA-OSIGUWA, S. A.; FRASER, L. R. A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 497-508, Oct 2005.

GOTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 10, p. 3420-35, Jun 2008.

GREGORY, M.; CYR, D. G. The blood-epididymis barrier and inflammation. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. e979619, May-Aug 2014.

GRUENHEID, S.; LE MOUAL, H. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 330, n. 2, p. 81-9, May 2012.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 5, n. 6, p. 951-9, Dec 2007.

HALL, S. H.; HAMIL, K. G.; FRENCH, F. S. Host defense proteins of the male reproductive tract. **Journal of andrology**, v. 23, n. 5, p. 585-97, Sep-Oct 2002.

HALL, S. H. et al. Characterization and functions of beta defensins in the epididymis. **Asian journal of andrology**, v. 9, n. 4, p. 453-62, Jul 2007.

HAN, F. et al. Porcine beta-defensin 2 attenuates inflammation and mucosal lesions in dextran sodium sulfate-induced colitis. **Journal of immunology**, v. 194, n. 4, p. 1882-93, Feb 15 2015.

HAN, Y. L. et al. Molecular cloning, expression pattern, and chemical analysis of heat shock protein 70 (HSP70) in the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*: Evidence for its role in regulating spermatogenesis. **Gene**, v. 575, n. 2 Pt 1, p. 331-8, Jan 10 2016.

HARVEY, L. E. et al. Defensin DEFB103 bidirectionally regulates chemokine and cytokine responses to a pro-inflammatory stimulus. **Scientific reports**, v. 3, p. 1232, 2013.

HE, X. Y. et al. Function of human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase in androgen metabolism. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1484, n. 2-3, p. 267-77, Apr 12 2000.

HERMO, L. et al. Alterations in the testis of hormone sensitive lipase-deficient mice is associated with decreased sperm counts, sperm motility, and fertility. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 4, p. 565-77, Apr 2008.

HERMO, L. et al. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. **Microscopy research and technique**, v. 73, n. 4, p. 241-78, Apr 2010a.

HERMO, L. et al. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. **Microscopy research and technique**, v. 73, n. 4, p. 279-319, Apr 2010b.

HERMO, L. et al. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 3: developmental changes in spermatid flagellum and cytoplasmic droplet and interaction of sperm with the zona pellucida and egg plasma membrane. **Microscopy research and technique**, v. 73, n. 4, p. 320-63, Apr 2010c.

HESS, R. A. et al. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. **Journal of andrology**, v. 32, n. 6, p. 600-13, Nov-Dec 2011.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 636, p. 1-15, 2008.

HILBE, M. et al. Histomorphological and immunohistochemical findings in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 148, n. 11, p. 599-608, Nov 2006.

HINTON, B. T. Future of andrology. **Journal of andrology**, v. 21, n. 2, p. 339, Mar-Apr 2000.

HIYAMA, G. et al. Sperm activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Reproduction**, v. 147, n. 2, p. 167-78, Feb 2014.

HOLLAND, A.; OHLENDIECK, K. Comparative profiling of the sperm proteome. **Proteomics**, v. 15, n. 4, p. 632-48, Feb 2015.

HOUSTON, B.; CURRY, B.; AITKEN, R. J. Human spermatozoa possess an IL4I1 l-amino acid oxidase with a potential role in sperm function. **Reproduction**, v. 149, n. 6, p. 587-96, Jun 2015.

HU, S. G. et al. Androgenic regulation of beta-defensins in the mouse epididymis. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 76, 2014.

HUBER-EICHER, B.; SPRING, P. Attitudes of Swiss consumers towards meat from entire or immunocastrated boars: a representative survey. **Research in veterinary science**, v. 85, n. 3, p. 625-7, Dec 2008.

HURTADO DE LLERA, A. et al. AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38840, 2012.

HURTADO DE LLERA, A. et al. AMPK up-activation reduces motility and regulates other functions of boar spermatozoa. **Molecular human reproduction**, v. 21, n. 1, p. 31-45, Jan 2015.

HURTADO DE LLERA, A. et al. AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1828, n. 9, p. 2143-51, Sep 2013.

IBRAHIM, N. M.; YOUNG, L. G.; FROHLICH, O. Epididymal specificity and androgen regulation of rat EP2. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 2, p. 575-80, Aug 2001.

JARCZAK, J. et al. Defensins: natural component of human innate immunity. **Human immunology**, v. 74, n. 9, p. 1069-79, Sep 2013.

JELINSKY, S. A. et al. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 4, p. 561-70, Apr 2007.

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 143-72, Aug 18 2000.

JOO, H. S.; OTTO, M. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1848, n. 11 Pt B, p. 3055-61, Nov 2015.

JOSEPH, A.; SHUR, B. D.; HESS, R. A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 2, p. 207-17, Feb 2011.

KAISER, V.; DIAMOND, G. Expression of mammalian defensin genes. **Journal of leukocyte biology**, v. 68, n. 6, p. 779-84, Dec 2000.

KALLO, G. et al. Relative quantification of human beta-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 29, n. 18, p. 1623-31, Sep 30 2015.

KATOH, Y. et al. Porcine sperm capacitation involves tyrosine phosphorylation and activation of aldose reductase. **Reproduction**, v. 148, n. 4, p. 389-401, Oct 2014.

KIM, J. T. et al. Acrosin-binding protein (ACRBP) in the testes of stallions. **Animal reproduction science**, v. 163, p. 179-86, Dec 2015.

KLUVER, E.; ADERMANN, K.; SCHULZ, A. Synthesis and structure-activity relationship of beta-defensins, multi-functional peptides of the immune system. **Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society**, v. 12, n. 4, p. 243-57, Apr 2006.

KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 83-93, Jan 1 2016.

KOBAYASHI, T. et al. Glycogen synthase kinase 3 and h-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 3, p. 898-911, Feb 2006.

KOHSAKA, T. et al. A new technique for the precise location of lactate and malate dehydrogenases in goat, boar and water buffalo spermatozoa using gel incubation film. **Journal of reproduction and fertility**, v. 95, n. 1, p. 201-9, May 1992.

KONGMANAS, K. et al. Proteomic Characterization of Pig Sperm Anterior Head Plasma Membrane Reveals Roles of Acrosomal Proteins in ZP3 Binding. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 2, p. 449-63, Feb 2015.

KRISFALUSI, M. et al. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 2, p. 270-8, Aug 2006.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567-80, Jan 19 2001.

KUNO, M. et al. The presence of a glycosyl phosphatidylinositol-anchored alpha-mannosidase in boar sperm. **IUBMB life**, v. 49, n. 6, p. 485-9, Jun 2000.

KURAVSKY, M. L. et al. Testis-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: origin and evolution. **BMC evolutionary biology**, v. 11, p. 160, 2011.

KWON, W. S. et al. Discovery of predictive biomarkers for litter size in boar spermatozoa. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 14, n. 5, p. 1230-40, May 2015.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. The potential of antimicrobial peptides as biocides. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 10, p. 6566-96, 2011.

LEE, H. et al. Creatine synthesis and transport systems in the male rat reproductive tract. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 6, p. 1437-44, Jun 1998.

LEGARE, C. et al. Investigation of male infertility using quantitative comparative proteomics. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 12, p. 5403-14, Dec 5 2014.

LEONARD, B. C. et al. Activity, expression and genetic variation of canine beta-defensin 103: a multifunctional antimicrobial peptide in the skin of domestic dogs. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 3, p. 248-59, 2012.

LI, C. J.; WANG, D.; ZHOU, X. Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. **Animal reproduction science**, v. 173, p. 1-7, Oct 2016.

LI, C. L. et al. Cloning, expression and characterization of antimicrobial porcine beta defensin 1 in Escherichia coli. **Protein expression and purification**, v. 88, n. 1, p. 47-53, Mar 2013a.

LI, C. L. et al. Molecular cloning, expression and characterization of the porcine beta defensin 2 in E. coli. **Protein and peptide letters**, v. 20, n. 6, p. 715-23, Jun 2013b.

LI, Y. et al. Immunization against recombinant GnRH-I alters testicular structure in an experimental boar model. **Zygote**, v. 23, n. 1, p. 125-35, Feb 2015.

LIN, Y. N. et al. Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 19, p. 6794-805, Oct 2007.

LOOFT, C. et al. Sequence analysis of a 212 kb defensin gene cluster on ECA 27q17. **Gene**, v. 376, n. 2, p. 192-8, Jul 19 2006.

LUNDGREN, D. H. et al. Role of spectral counting in quantitative proteomics. **Expert review of proteomics**, v. 7, n. 1, p. 39-53, Feb 2010.

LYDKA, M. et al. Morphological and functional alterations in adult boar epididymis: Effects of prenatal and postnatal administration of flutamide. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 12, 2011.

MAO, H. T.; YANG, W. X. Modes of acrosin functioning during fertilization. **Gene**, v. 526, n. 2, p. 75-9, Sep 10 2013.

MARANTIDIS, A. et al. Study of Toll-like receptor and B-defensins genes expression pattern in porcine reproductive organs. **Animal biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 188-93, 2015.

MARDIROSSIAN, M. et al. The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. **Chemistry & biology**, v. 21, n. 12, p. 1639-47, Dec 18 2014.

MARGARYAN, H. et al. Characterization and possible function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-spermatogenic protein GAPDHS in mammalian sperm. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 13, p. 15, 2015.

MARTIN-HIDALGO, D. et al. Adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 285-94, Sep 1 2013.

MARTIN, L. et al. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 404, 2015.

MARTINEZ-HEREDIA, J. et al. Proteomic identification of human sperm proteins. **Proteomics**, v. 6, n. 15, p. 4356-69, Aug 2006.

MATARACI, E.; DOSLER, S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6366-71, Dec 2012.

MCDONALD, W. H. et al. MS1, MS2, and SQT-three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 18, n. 18, p. 2162-8, 2004.

MEADE, K. G. et al. Bovine beta-defensin gene family: opportunities to improve animal health? **Physiological genomics**, v. 46, n. 1, p. 17-28, Jan 1 2014.

MIRABZADEH-ARDAKANI, A. et al. Tissue- and age-dependent expression of the bovine DEFB103 gene and protein. **Cell and tissue research**, v. 363, n. 2, p. 479-90, Feb 2016.

MITAL, P.; HINTON, B. T.; DUFOUR, J. M. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 5, p. 851-8, May 2011.

MITRA, K.; RANGARAJ, N.; SHIVAJI, S. Novelty of the pyruvate metabolic enzyme dihydrolipoamide dehydrogenase in spermatozoa: correlation of its localization, tyrosine phosphorylation, and activity during sperm capacitation. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 27, p. 25743-53, Jul 8 2005.

MITRA, K.; SHIVAJI, S. Novel tyrosine-phosphorylated post-pyruvate metabolic enzyme, dihydrolipoamide dehydrogenase, involved in capacitation of hamster spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 4, p. 887-99, Apr 2004.

MOORE, K. L. **Embriologia Básica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 365 p.

MUGHAL, I. A. et al. Sperm mitochondrial DNA 15bp deletion of cytochrome c oxidase subunit III is significantly associated with human male infertility in Pakistan. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 66, n. 1, p. 3-7, Jan 2016.

MUKHERJEE, M.; CHATTOPADHYAY, S.; MATHUR, P. P. Effect of flutamide on the physiological status of epididymis and epididymal sperms. **Andrologia**, v. 24, n. 2, p. 113-6, Mar-Apr 1992.

NAGAOKA, I. et al. Modulation of neutrophil apoptosis by antimicrobial peptides. **ISRN microbiology**, v. 2012, p. 345791, 2012.

NAGDAS, S. K.; WINFREY, V. P.; OLSON, G. E. Identification of a hamster sperm 26-kilodalton dehydrogenase/reductase that is exclusively localized to the mitochondria of the flagellum. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 2, p. 197-202, Aug 2006.

NAKAMURA, N. et al. Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (eno4) gene causes sperm structural defects and male infertility. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 4, p. 90, Apr 2013.

NARCIANDI, F. et al. A novel subclass of bovine beta-defensins links reproduction and immunology. **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, n. 6, p. 769-77, 2014.

NARCIANDI, F. et al. Reproductive tissue-specific expression profiling and genetic variation across a 19 gene bovine beta-defensin cluster. **Immunogenetics**, v. 63, n. 10, p. 641-51, Oct 2011.

NAVARRO, B.; KIRICHOK, Y.; CLAPHAM, D. E. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 18, p. 7688-92, May 1 2007.

NOYES, B. E.; BRADSHAW, R. A. L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase from pig heart muscle. I. Purification and properties. **The Journal of biological chemistry**, v. 248, n. 9, p. 3052-9, May 10 1973.

NRC. **Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition**. Washington, DC: The National Academies Press, 2012. 400 p. ISBN 978-0-309-22423-9.

ODET, F. et al. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 1, p. 26-34, Jul 2008.

ODET, F. et al. Glycolysis and mitochondrial respiration in mouse LDHC-null sperm. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 4, p. 95, Apr 2013.

OKAMURA, N. et al. Cloning of complementary DNA encoding a 135-kilodalton protein secreted from porcine corpus epididymis and its identification as an epididymis-specific alpha-mannosidase. **Molecular reproduction and development**, v. 42, n. 2, p. 141-8, Oct 1995.

OPPENHEIM, J. J. et al. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 62 Suppl 2, p. ii17-21, Nov 2003.

PALLADINO, M. A.; MALLONGA, T. A.; MISHRA, M. S. Messenger RNA (mRNA) expression for the antimicrobial peptides beta-defensin-1 and beta-defensin-2 in the male rat reproductive tract: beta-defensin-1 mRNA in initial segment and caput epididymidis is regulated by androgens and not bacterial lipopolysaccharides. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 2, p. 509-15, Feb 2003.

PAOLI, D. et al. Sperm glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene expression in asthenozoospermic spermatozoa. **Asian journal of andrology**, Apr 15 2016.

PARK, K. et al. Proteomic analysis of boar spermatozoa and quantity changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin 5 during epididymal maturation. **Animal reproduction science**, v. 135, n. 1-4, p. 53-61, Nov 2012.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Critical reviews in biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 143-71, Jun 2012.

PATIL, A. A. et al. Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. **Physiological genomics**, v. 23, n. 1, p. 5-17, Sep 21 2005.

PENA, S., JR. et al. Oviduct binding ability of porcine spermatozoa develops in the epididymis and can be advanced by incubation with caudal fluid. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1502-13, Jun 2015.

PEROBELLI, J. E. et al. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive toxicology**, v. 33, n. 3, p. 308-15, Jun 2012.

PEROBELLI, J. E. et al. Androgen deprivation from pre-puberty to peripuberty interferes in proteins expression in pubertal and adult rat epididymis. **Reproductive toxicology**, v. 38, p. 65-71, Jul 2013.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, v. 8, n. 10, p. 785-6, 2011.

PETIT, F. M. et al. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. **Human reproduction**, v. 28, n. 4, p. 852-65, Apr 2013.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.

PFIZER. BOPRIVA, Vacina para Imunocastração de Bovinos - Bula. 2015.

PIETREMENT, C. et al. Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 1, p. 185-94, Jan 2006.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2183-5, Jun 21 2002.

PUJANTO, D. A. et al. Sperm-associated antigen 11A is expressed exclusively in the principal cells of the mouse caput epididymis in an androgen-dependent manner. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 11, p. 59, Jul 01 2013.

QI, S. et al. β -defensins gene expression in tissues of the crossbred and Tibetan pigs. v. 123, p. 8, 2009.

RADHAKRISHNAN, Y. et al. Novel partners of SPAG11B isoform D in the human male reproductive tract. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 4, p. 647-56, Oct 2009.

RADHAKRISHNAN, Y. et al. Identification, characterization, and evolution of a primate beta-defensin gene cluster. **Genes and immunity**, v. 6, n. 3, p. 203-10, May 2005.

RAHMAN, M. S. et al. Bisphenol-A affects male fertility via fertility-related proteins in spermatozoa. **Scientific reports**, v. 5, p. 9169, 2015.

RETAMAL, C. A. et al. Alpha-mannosidase activity in stallion epididymal fluid and spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 252-62, Jul 15 2012.

RIBEIRO, C. M. et al. Dynamic changes in the spatio-temporal expression of the beta-defensin SPAG11C in the developing rat epididymis and its regulation by androgens. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 404, p. 141-50, Mar 15 2015.

RIBEIRO, C. M.; ROMANO, R. M.; AVELLAR, M. C. Beta-defensins in the epididymis: clues to multifunctional roles **Animal Reproduction Science**, v. 9, n. 4, p. 9, 2012.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 154-60, Feb 15 1997.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. **The epididymis: from molecules to clinical practice: a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis, and the vas deferens**. New York: Plenum Publishers, 2002. 571 p. ISBN 978-1-4613-5191-7.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. The epididymis. In: (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 4: Academic Press - Elsevier, v.1, 2015. cap. 17, p.691-771.

RODRIGUEZ-JIMENEZ, F. J. et al. Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. **Genomics**, v. 81, n. 2, p. 175-83, Feb 2003.

ROHRER, G. A. Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) maps to Xq1.2 in the porcine genome. **Journal of animal science**, v. 77, n. 2, p. 497-8, Feb 1999.

ROTTNER, S.; CLAUS, R. Return of testicular function after vaccination of boars against GnRH: consequences on testes histology. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 3, n. 9, p. 1279-86, Sep 2009.

RUIZ-PESINI, E. et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical chemistry**, v. 44, n. 8 Pt 1, p. 1616-20, Aug 1998.

SANG, Y.; BLECHA, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 9, n. 2, p. 227-35, Dec 2008.

SANG, Y. et al. Bioinformatic and expression analysis of novel porcine beta-defensins. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 17, n. 4, p. 332-9, Apr 2006.

SANG, Y. et al. Gene silencing and overexpression of porcine peptidoglycan recognition protein long isoforms: involvement in beta-defensin-1 expression. **Infection and immunity**, v. 73, n. 11, p. 7133-41, Nov 2005.

SANTI, L. et al. Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 3, p. 1545-59, Mar 7 2014.

SASS, V. et al. Mode of action of human beta-defensin 3 against *Staphylococcus aureus* and transcriptional analysis of responses to defensin challenge. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 298, n. 7-8, p. 619-33, Oct 2008.

SCHORR-LENZ, A. M. et al. GnRH immunization alters the expression and distribution of protein disulfide isomerases in the epididymis. **Andrology**, Jun 20 2016.

SCHUBERTH, H. J. et al. Immunological responses to semen in the female genital tract. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1174-81, Nov 2008.

SCUDIERO, O. et al. Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2312-22, Jun 2010.

SCUDIERO, O. et al. Chimeric beta-defensin analogs, including the novel 3NI analog, display salt-resistant antimicrobial activity and lack toxicity in human epithelial cell lines. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1701-8, Apr 2013.

SELSTED, M. E. et al. Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 9, p. 6641-8, Mar 25 1993.

SEMPLE, C. A.; ROLFE, M.; DORIN, J. R. Duplication and selection in the evolution of primate beta-defensin genes. **Genome biology**, v. 4, n. 5, p. R31, 2003.

SEMPLE, F.; DORIN, J. R. beta-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 4, p. 337-48, 2012.

SHI, J. et al. Porcine epithelial beta-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. **Infection and immunity**, v. 67, n. 6, p. 3121-7, Jun 1999.

SILVA, N. C.; SARMENTO, B.; PINTADO, M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology. **International journal of antimicrobial agents**, v. 41, n. 1, p. 5-10, Jan 2013.

SISTI, G. et al. Interaction between the inducible 70-kDa heat shock protein and autophagy: effects on fertility and pregnancy. **Cell stress & chaperones**, v. 20, n. 5, p. 753-8, Sep 2015.

SIVA, A. B. et al. Inhibiting sperm pyruvate dehydrogenase complex and its E3 subunit, dihydrolipoamide dehydrogenase affects fertilization in Syrian hamsters. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e97916, 2014.

SKALHEGG, B. S. et al. Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. **Molecular endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 630-9, Mar 2002.

SMITHWICK, E. B.; YOUNG, L. G. Histological effects of androgen deprivation on the adult chimpanzee epididymis. **Tissue & cell**, v. 33, n. 5, p. 450-61, Oct 2001.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. 770 p.

SOMANATH, P. R.; JACK, S. L.; VIJAYARAGHAVAN, S. Changes in sperm glycogen synthase kinase-3 serine phosphorylation and activity accompany motility initiation and stimulation. **Journal of andrology**, v. 25, n. 4, p. 605-17, Jul-Aug 2004.

SOUZA, B. B. et al. Genetic polymorphisms in beta-defensin II gene in Amazon sheep from Brazil. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 14, n. 4, p. 12805-10, 2015.

STOLZENBERG, E. D. et al. Epithelial antibiotic induced in states of disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 16, p. 8686-90, Aug 5 1997.

STOREY, B. T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. **The International journal of developmental biology**, v. 52, n. 5-6, p. 427-37, 2008.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. R21-35, Jul 2013.

SWINDLE, M. M. et al. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. **Veterinary pathology**, v. 49, n. 2, p. 344-56, Mar 2012.

SYNTIN, P. et al. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 5, p. 956-74, Nov 1996.

SYNTIN, P.; DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1622-35, Dec 1999.

TABB, D. L.; MCDONALD, W. H.; YATES, J. R., 3RD. DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. **Journal of proteome research**, v. 1, n. 1, p. 21-6, Jan-Feb 2002.

TAKEI, G. L. et al. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. **The Journal of experimental biology**, v. 217, n. Pt 11, p. 1876-86, Jun 1 2014.

TANG, Y. Q. et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 498-502, Oct 15 1999.

TAVARES, L. S. et al. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 412, 2013.

THIMON, V. et al. Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. **Molecular human reproduction**, v. 13, n. 10, p. 691-704, Oct 2007.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinaria**. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 551 p.

TOEI, M.; SAUM, R.; FORGAC, M. Regulation and isoform function of the V-ATPases. **Biochemistry**, v. 49, n. 23, p. 4715-23, Jun 15 2010.

TOLLNER, T. L.; BEVINS, C. L.; CHERR, G. N. Multifunctional glycoprotein DEFB126--a curious story of defensin-clad spermatozoa. **Nature reviews. Urology**, v. 9, n. 7, p. 365-75, Jul 2012.

TOLLNER, T. L. et al. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. **Science translational medicine**, v. 3, n. 92, p. 92ra65, Jul 20 2011.

TOLLNER, T. L. et al. Beta-defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 3, p. 400-12, Mar 2008a.

TOLLNER, T. L. et al. Macaque sperm coating protein DEF126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. **Human reproduction**, v. 23, n. 11, p. 2523-34, Nov 2008b.

TOMAR, R. et al. Altered expression of succinic dehydrogenase in asthenozoospermia infertile male. **American journal of reproductive immunology**, v. 68, n. 6, p. 486-90, Dec 2012.

TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. Antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1848, n. 11 Pt B, p. 3026-31, Nov 2015.

UNIVATES. MISSÃO / VISÃO / PRÍNCIPIOS. Lajeado, 2015. Disponível em: <<http://www.univates.br/institucional/missao-visao-principios>>.

USAMI, N. et al. Cloning, expression and tissue distribution of a tetrameric form of pig carbonyl reductase. **Chemico-biological interactions**, v. 143-144, p. 353-61, Feb 1 2003.

VAN WETTERE, W. H.; HERDE, P.; HUGHES, P. E. Supplementing sow gestation diets with betaine during summer increases litter size of sows with greater numbers of parities. **Animal reproduction science**, v. 132, n. 1-2, p. 44-9, May 2012.

VELDHUIZEN, E. J. et al. Porcine beta-defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. **Molecular immunology**, v. 45, n. 2, p. 386-94, Jan 2008.

VILAGRAN, I. et al. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. **Theriogenology**, v. 80, n. 5, p. 443-50, Sep 15 2013.

WANG, G. et al. In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. **Journal of proteomics**, v. 79, p. 114-22, Feb 21 2013.

WERNERSSON, R. et al. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. **BMC genomics**, v. 6, p. 70, 2005.

WICKS, N.; CROUCH, S.; PEARL, C. A. Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. **Animal reproduction science**, v. 142, n. 3-4, p. 149-59, Nov 30 2013.

WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 22, n. 4, p. 680-95, Jul-Aug 2001.

WISHART, G. J.; CARVER, L. Glycolytic enzymes of fowl and turkey spermatozoa. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 79, n. 3, p. 453-5, 1984.

XIAO, H. et al. The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 19, 2015.

XIAO, H. et al. Effects of composite antimicrobial peptides in weanling piglets challenged with deoxynivalenol: I. Growth performance, immune function, and antioxidation capacity. **Journal of animal science**, v. 91, n. 10, p. 4772-80, Oct 2013.

XIN, A. et al. Characterization of beta-defensin 42 expressed in principal cells at the initial segment of the rat epididymis. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 47, n. 11, p. 861-9, Nov 2015.

YANG, C. et al. LRRC52 (leucine-rich-repeat-containing protein 52), a testis-specific auxiliary subunit of the alkalization-activated Slo3 channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 48, p. 19419-24, Nov 29 2011.

YANG, D. et al. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. **Trends in immunology**, v. 23, n. 6, p. 291-6, Jun 2002.

YANG, D. et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 525-8, Oct 15 1999.

YANG, X. et al. Overexpression of porcine beta-defensin 2 enhances resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. **Infection and immunity**, Apr 27 2015.

YATSENKO, A. N. et al. Association of mutations in the zona pellucida binding protein 1 (ZBP1) gene with abnormal sperm head morphology in infertile men. **Molecular human reproduction**, v. 18, n. 1, p. 14-21, Jan 2012.

YESTE, M. et al. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17 degrees C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90887, 2014.

YEUNG, A. T.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 13, p. 2161-76, Jul 2011.

YUDIN, A. I. et al. Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 6, p. 1243-52, Dec 2005.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-95, Jan 24 2002.

ZENG, X. et al. Induction of porcine host defense peptide gene expression by short-chain fatty acids and their analogs. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72922, 2013.

ZENG, X. H. et al. SLO3 auxiliary subunit LRRC52 controls gating of sperm KSPER currents and is critical for normal fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 8, p. 2599-604, Feb 24 2015.

ZHANG, G. et al. Cloning and characterization of the gene for a new epithelial beta-defensin. Genomic structure, chromosomal localization, and evidence for its constitutive expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 34, p. 24031-7, Aug 20 1999.

ZHANG, G. et al. Molecular cloning and tissue expression of porcine beta-defensin-1. **FEBS letters**, v. 424, n. 1-2, p. 37-40, Mar 6 1998.

ZHAO, L.; LU, W. Defensins in innate immunity. **Current opinion in hematology**, v. 21, n. 1, p. 37-42, Jan 2014.

ZHAO, Y. et al. The epididymis-specific antimicrobial peptide beta-defensin 15 is required for sperm motility and male fertility in the rat (*Rattus norvegicus*). **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 4, p. 697-708, Feb 2011.

ZHOU, C. X. et al. An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. **Nature cell biology**, v. 6, n. 5, p. 458-64, May 2004.

ZHOU, Y. S. et al. Partial deletion of chromosome 8 beta-defensin cluster confers sperm dysfunction and infertility in male mice. **PLoS genetics**, v. 9, n. 10, p. e1003826, Oct 2013.

ZHU, S.; GAO, B. Evolutionary origin of beta-defensins. **Developmental and comparative immunology**, v. 39, n. 1-2, p. 79-84, Jan-Feb 2013.

ZOETIS. Informações de bula - Vivax ®. 2015. Disponível em: <http://www.improvac.com/br/informa%C3%A7%C3%B5es-de-bula.aspx>.

Apêndice A - Proteínas relacionadas com a glicólise, metabolismo de frutose e manose e metabolismo da galactose. As proteínas são apresentadas com informações obtidas por análise de bioinformática.

Número de acesso	Spectral counts	Nome da proteína	Comprimento (aa)	TargetP	SignalP	TMHMM	Rota metabólica
XP_005652652.1	741	gamma-enolase enolase like protein eno4	434	-	no	outside	Glycolysis
		GO: magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity; gluconeogenesis; extracellular space; myelin sheath; extracellular exosome; protein binding; photoreceptor inner segment; perikaryon; canonical glycolysis; phosphopyruvate hydratase complex; plasma membrane					
XP_005661147.1	476	l-lactate dehydrogenase a chain isoform x1	361	-	no	outside	Glycolysis
		GO: nucleus; cellular response to extracellular stimulus; extracellular exosome; L-lactate dehydrogenase activity; glucose catabolic process to lactate via pyruvate; mitochondrion; membrane; cytosol; sperm fibrous sheath; substantia nigra development					
NP_001093402.1	348	phosphoglycerate kinase 1	517	-	no	outside	Glycolysis
		GO: epithelial cell differentiation; ATP binding; gluconeogenesis; extracellular exosome; protein binding; phosphoglycerate kinase activity; membrane raft; cytosol; canonical glycolysis					
XP_003483583.1	289	phosphoglycerate mutase 1	254	-	no	outside	Glycolysis
		GO: protein kinase binding; gluconeogenesis; myelin sheath; bisphosphoglycerate 2-phosphatase activity; bisphosphoglycerate mutase activity; regulation of glycolytic process; respiratory burst; 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase activity; canonical glycolysis; regulation of pentose-phosphate shunt; nucleus; extracellular exosome; membrane; cytosol; sperm principal piece; dephosphorylation					
NP_999227.1	235	dihydrolipoyl mitochondrial	509	m	no	outside	Glycolysis
		GO: myelin sheath; mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone; lipoamide binding; mitochondrial acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; dihydrolipoyl dehydrogenase activity; 2-oxoglutarate metabolic process; nucleoplasm; dihydrolipoamide metabolic process; sperm capacitation; pyruvate dehydrogenase complex; NAD binding; glyoxylate metabolic process; oxoglutarate dehydrogenase complex; cilium; pyruvate dehydrogenase (NAD+) activity; regulation of acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; branched-chain amino acid catabolic process; tricarboxylic acid cycle; cell redox homeostasis; aging; acrosomal matrix; lysine catabolic process; gastrulation; lipoate metabolic process; regulation of membrane potential; mitochondrial matrix; flavin adenine dinucleotide binding; proteolysis					
NP_001193288.1	229	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	333	m	no	outside	Glycolysis
		GO: microtubule cytoskeleton; glycolytic process; microtubule cytoskeleton organization; glucose metabolic process; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity; microtubule binding; GAIT complex; regulation of translation; nucleus; NADP binding; peptidyl-cysteine S-trans-nitrosylation; NAD binding; cytosol; oxidation-reduction process; peptidyl-cysteine S-nitrosylase activity; protein stabilization; neuron apoptotic process					
NP_001001539.1	151	aldose reductase	316	-	no	outside	Galactose, Fructose, Mannose
		GO: extracellular exosome; cytoplasm; alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity; daunorubicin metabolic process; 17-alpha,20-alpha-dihydroypregn-4-en-3-one dehydrogenase activity; oxidation-reduction process; glyceraldehyde oxidoreductase activity; doxorubicin metabolic process; nucleoplasm					

NP_999145.1	58	utp--glucose-1-phosphate uridylyltransferase isoform x1	508	-	no	outside	Galactose
		GO: nucleus; identical protein binding; extracellular exosome; cytoplasm; metal ion binding; UDP-glucose metabolic process; UTglucose-1-phosphate uridylyltransferase activity					
NP_001233247.1	46	phosphoglucomutase-1 isoform x2	562	-	no	outside	Galactose, Glycolysis
		GO: magnesium ion binding; phosphoglucomutase activity; glycogen biosynthetic process; extracellular exosome; calcium ion binding; actin cytoskeleton; galactose catabolic process; cytosol; glucose metabolic process					
XP_005660882.1	39	bifunctional atp-dependent dihydroxyacetone kinase fad-amp lyase	534	s	no	Inside TMhelix	Fructose, Mannose
		GO: triokinase activity; glycerol metabolic process; nucleus; ATP binding; extracellular exosome; negative regulation of MDA-5 signaling pathway; FAD-AMP lyase (cyclizing) activity; metal ion binding; glycerone kinase activity; carbohydrate phosphorylation					
NP_001116694.1	36	alpha-n-acetylgalactosaminidase isoform x1	411	s	yes	outside	Galactose
		GO: alpha-galactosidase activity; glycoside catabolic process; extracellular exosome; protein homodimerization activity; carbohydrate catabolic process; alpha-N-acetylgalactosaminidase activity; glycolipid catabolic process; lysosome					
XP_001927148.2	34	acetyl-coenzyme a synthetase 2- mitochondrial	672	m	no	outside	Glycolysis
		GO: ATP binding; acetate-CoA ligase activity; AMP binding; mitochondrial matrix; integral component of membrane; propionate biosynthetic process; acetate biosynthetic process; acetyl-CoA biosynthetic process from acetate					
XP_005666246.1	31	pyruvate kinase pkm isoform x1	531	-	no	outside	Glycolysis
		GO: myelin sheath; glycolytic process; MHC class II protein complex binding; plasma membrane; poly(A) RNA binding; magnesium ion binding; nucleus; pyruvate kinase activity; ATP binding; extracellular exosome; potassium ion binding; mitochondrion; cilium; extracellular matrix; kinase activity; programmed cell death					
XP_005659618.1	31	retinal dehydrogenase 2 isoform x3	291	-	no	outside	Glycolysis
		GO: neural tube development; response to cytokine; midgut development; negative regulation of cell proliferation; positive regulation of cell proliferation; anterior/posterior pattern specification; retinol metabolic process; retinal metabolic process; cardiac muscle tissue development; face development; determination of bilateral symmetry; proximal/distal pattern formation; heart morphogenesis; retinoic acid receptor signaling pathway; blood vessel development; embryonic digestive tract development; kidney development; hindbrain development; liver development; cytosol; morphogenesis of embryonic epithelium; embryonic forelimb morphogenesis; lung development; pancreas development; ureter maturation; neural crest cell development; neuron differentiation; embryonic camera-type eye development; 9-cis-retinoic acid biosynthetic process; retinal binding; vitamin A metabolic process; pituitary gland development; aldehyde dehydrogenase (NAD) activity; 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase activity; perinuclear region of cytoplasm; cellular response to retinoic acid; positive regulation of gene expression; retinal dehydrogenase activity; positive regulation of apoptotic process; response to estradiol; regulation of endothelial cell proliferation; oxidation-reduction process; response to vitamin A					
XP_001928410.1	30	beta-galactosidase-1-like protein isoform x1	652	s	yes	outside	Galactose
		GO: carbohydrate metabolic process; beta-galactosidase activity					
XP_005657046.1	27	fructose-bisphosphate aldolase c	364	-	no	outside	Fructose, Mannose, Glycolysis

		GO: epithelial cell differentiation; extracellular exosome; mitochondrion; glycolytic process; cytoskeletal protein binding; fructose-bisphosphate aldolase activity; fructose 1,6-bisphosphate metabolic process					
NP_001230113.1	27	hexokinase-1	916	-	no	outside	Galactose, Fructose, Mannose, Glycolysis
		GO: glycolytic process; glucokinase activity; positive regulation of mitophagy; carbohydrate phosphorylation; fructokinase activity; glucose binding; ATP binding; glucose 6-phosphate metabolic process; cellular glucose homeostasis; mitochondrion; membrane raft; cytosol; sperm principal piece; maintenance of protein location in mitochondrion; establishment of protein localization to mitochondrion; mannokinase activity					
NP_001240850.1	24	mannose-6-phosphate isomerase isoform x1	423	-	no	outside	Fructose, Mannose
		GO: zinc ion binding; extracellular exosome; cytoplasm; GDP-mannose biosynthetic process; mannose-6-phosphate isomerase activity; mannose to fructose-6-phosphate metabolic process					
XP_005666286.1	23	phosphoenolpyruvate carboxykinase	640	m	no	outside	Glycolysis
		GO: GTP binding; gluconeogenesis; extracellular exosome; phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity; mitochondrion; phosphorylation; kinase activity					
NP_001032228.1	21	triosephosphate isomerase	248	-	no	outside	Fructose, Mannose, Glycolysis
		GO: nucleus; gluconeogenesis; extracellular space; extracellular exosome; ubiquitin protein ligase binding; pentose-phosphate shunt; multicellular organism development; glycolytic process; glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process; triose-phosphate isomerase activity; cytosol; glycerol catabolic process					
XP_005657378.1	16	aldehyde mitochondrial	474	m	no	outside	Glycolysis
		GO: aldehyde dehydrogenase (NAD) activity; carbohydrate metabolic process; extracellular exosome; mitochondrial matrix; aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] activity; electron carrier activity; xenobiotic metabolic process; ethanol catabolic process; ethanol oxidation; synaptic transmission; neurotransmitter biosynthetic process					
XP_003484129.1	12	pyruvate dehydrogenase e1 component subunit 359 somatic mitochondrial isoform x2		m	no	outside	Glycolysis
		GO: nucleus; myelin sheath; pyruvate dehydrogenase complex; mitochondrial matrix; glyoxylate metabolic process; pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity; tricarboxylic acid cycle; pyruvate dehydrogenase (NAD+) activity; glucose metabolic process; mitochondrial acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; regulation of acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate					
XP_005657233.1	12	atp-dependent 6- liver type	759	-	no	outside	Galactose, Fructose, Mannose, Glycolysis
		GO: identical protein binding; fructose 6-phosphate metabolic process; glycolytic process through fructose-6-phosphate; negative regulation of insulin secretion; 6-phosphofructokinase activity; ATP binding; 6-phosphofructokinase complex; fructose binding; response to glucose; extracellular exosome; fructose-6-phosphate binding; metal ion binding; membrane; dephosphorylation; fructose 1,6-bisphosphate metabolic process; kinase binding; protein oligomerization					
NP_001090964.1	10	ribose-5-phosphate isomerase	306	m	no	outside	Fructose, Mannose

		GO: carbohydrate metabolic process; pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch; protein binding; intracellular membrane-bounded organelle; cytosol; monosaccharide binding; ribose-5-phosphate isomerase activity					
NP_001231762.1	9	alcohol dehydrogenase class-3	385	-	no	outside	Glycolysis
		GO: peptidyl-cysteine S-nitrosylation; zinc ion binding; protein homodimerization activity; ethanol oxidation; alcohol dehydrogenase (NAD) activity; positive regulation of blood pressure; respiratory system process; response to redox state; extracellular exosome; fatty acid binding; retinoid metabolic process; formaldehyde catabolic process; mitochondrion; S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase activity; response to nitrosative stress; response to lipopolysaccharide; formaldehyde dehydrogenase activity					
NP_999159.1	6	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase 647 component of pyruvate dehydrogenase mitochondrial	647	m	no	outside	Glycolysis
		GO: myelin sheath; pyruvate dehydrogenase complex; mitochondrial matrix; pyruvate metabolic process; dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase activity					
XP_003128195.3	6	gdp-mannose dehydratase	350	s	yes	outside	Fructose, Mannose
		GO: extracellular exosome; protein binding; Notch signaling pathway; 'de novo' GDP-L-fucose biosynthetic process; NADP+ binding; cytosol; GDP-mannose metabolic process; protein N-linked glycosylation via asparagine; post-translational protein modification; dolichol-linked oligosaccharide biosynthetic process; GDP-mannose 4,6-dehydratase activity					
XP_003131402.1	4	glucose-6-phosphatase 3	346	s	no	TMhelix Inside	Galactose, Glycolysis
		GO: gluconeogenesis; glucose 6-phosphate metabolic process; glucose-6-phosphate transport; integral component of endoplasmic reticulum membrane; dephosphorylation; glucose-6-phosphatase activity					
XP_003125388.1	4	retinol dehydrogenase 14	336	s	no	TMhelix Inside	Glycolysis
		GO: endoplasmic reticulum membrane; nucleus; mitochondrion; integral component of membrane; osteoblast differentiation; retinol metabolic process; oxidation-reduction process; lysosomal membrane; alcohol dehydrogenase (NADP+) activity					
XP_003124791.3	2	low quality protein: n-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	461	-	no	outside	Galactose
		GO: nucleus; carbohydrate metabolic process; protein binding; metal ion binding; N-acetylneuraminate catabolic process; N-acetylglucosamine catabolic process; N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase activity					
XP_005668651.1	2	lysosomal alpha-glucosidase	945	s	no	TMhelix Inside	Galactose
		GO: lysosome organization; muscle cell cellular homeostasis; maltose alpha-glucosidase activity; diaphragm contraction; cardiac muscle contraction; lysosomal membrane; tissue development; maltose metabolic process; regulation of the force of heart contraction; vacuolar sequestering; neuromuscular process controlling posture; heart morphogenesis; extracellular exosome; alpha-1,4-glucosidase activity; glycogen metabolic process; locomotory behavior; carbohydrate binding; neuromuscular process controlling balance					

Apêndice B - Proteínas relacionados com oxidação fosforilativa. As proteínas são apresentadas com informações obtidas por análise de bioinformática.

Número de acesso	Spectral counts	Nome da proteína	Comprimento (aa)	TargetP	SignalP	TMHMM
XP_005663542.1	20	protein prune homolog isoform x1 GO: nucleus; inorganic diphosphatase activity; protein binding; focal adhesion; cytoplasm; metal ion binding; exopolyphosphatase activity; polyphosphate catabolic process	464	-	no	outside
NP_001098423.1	7	succinate dehydrogenase GO: succinate dehydrogenase (ubiquinone) activity; electron carrier activity; respiratory electron transport chain; tricarboxylic acid cycle; ubiquinone binding; succinate metabolic process; plasma membrane; nucleoplasm; extracellular exosome; protein binding; mitochondrial respiratory chain complex II, succinate dehydrogenase complex (ubiquinone); metal ion binding; 3 iron, 4 sulfur cluster binding; 4 iron, 4 sulfur cluster binding; 2 iron, 2 sulfur cluster binding	453	m	no	outside
XP_003481271.2	7	v-type proton atpase subunit e 2 GO: ATP hydrolysis coupled proton transport; acrosomal vesicle; hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain	289	s	yes	transmembrane
YP_002600783.1	6	cytochrome c oxidase subunit iii GO: cytochrome-c oxidase activity; respiratory chain complex IV; integral component of membrane; hydrogen ion transmembrane transport; mitochondrial inner membrane; respiratory chain complex IV assembly; aerobic electron transport chain	306	s	no	transmembrane
XP_003122487.1	2	nadh dehydrogenase GO: FMN binding; NAD binding; NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity; 4 iron, 4 sulfur cluster binding; aerobic respiration; mitochondrial inner membrane	261	m	no	outside

Apêndice C - Proteínas relacionadas com metabolismo de aminoácidos. As proteínas são apresentadas com informações obtidas por análise de bioinformática.

Número de acesso	Spectral counts	Nome da proteína	Comprimento (aa)	TargetP	SignalP	TMHMM	Rota metabólica
XP_005661147.1	489	l-lactate dehydrogenase a chain isoform x1	361	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism
		GO: nucleus; cellular response to extracellular stimulus; extracellular exosome; L-lactate dehydrogenase activity; glucose catabolic process to lactate via pyruvate; mitochondrion; membrane; cytosol; sperm fibrous sheath; substantia nigra development					
NP_999227.1	235	dihydrolipoyl mitochondrial	509	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation
		GO: myelin sheath; mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone; lipoamide binding; mitochondrial acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; dihydrolipoyl dehydrogenase activity; 2-oxoglutarate metabolic process; nucleoplasm; dihydrolipoamide metabolic process; sperm capacitation; pyruvate dehydrogenase complex; NAD binding; glyoxylate metabolic process; oxoglutarate dehydrogenase complex; cilium; pyruvate dehydrogenase (NAD+) activity; regulation of acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; branched-chain amino acid catabolic process; tricarboxylic acid cycle; cell redox homeostasis; aging; acrosomal matrix; lysine catabolic process; gastrulation; lipoate metabolic process; regulation of membrane potential; mitochondrial matrix; flavin adenine dinucleotide binding; proteolysis					
NP_001231082.1	185	malate cytoplasmic	338	m	no	outside	cysteine and methionine metabolism
		GO: carbohydrate metabolic process; extracellular space; centrosome; L-malate dehydrogenase activity; myelin sheath; extracellular exosome; malate metabolic process; mitochondrion; cytosol; tricarboxylic acid cycle; mitophagy in response to mitochondrial depolarization; positive regulation of defense response to virus by host					
XP_003481945.2	127	l-amino-acid oxidase isoform x2	577	s	yes	transmembrane	alanine, aspartate and glutamate metabolism
		GO: L-amino-acid oxidase activity; oxidation-reduction process					
NP_001177104.1	124	methylglutaconyl-isoform x1	290	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation
		GO: methylglutaconyl-CoA hydratase activity; metabolic process; enoyl-CoA hydratase activity; mRNA 3'-UTR binding					
XP_005661566.1	87	betaine--homocysteine methyltransferase 1	s- 397	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism
		GO: zinc ion binding; extracellular exosome; cytoplasm; L-methionine salvage; betaine-homocysteine S-methyltransferase activity; amino-acid betaine catabolic process; S-adenosylmethionine-homocysteine S-methyltransferase activity; methylation					
NP_999496.1	87	hydroxyacyl-coenzyme mitochondrial	a 314	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation
		GO: fatty acid beta-oxidation; response to insulin; mitochondrial matrix; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity; response to drug; response to activity; negative regulation of insulin secretion; mitochondrial inner membrane; NAD+ binding; nucleoplasm					
NP_999092.1	77	aspartate mitochondrial	413	-	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism

								GO: pyridoxal phosphate binding; identical protein binding; myelin sheath; L-phenylalanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity; L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity; L-kynurenine metabolic process; mitochondrial inner membrane; plasma membrane; aspartate biosynthetic process; cell surface; poly(A) RNA binding; aspartate catabolic process; response to ethanol; oxaloacetate metabolic process; extracellular exosome; fatty acid transport; mitochondrial matrix; glutamate catabolic process to 2-oxoglutarate; glutamate catabolic process to aspartate; kynurenine-oxoglutarate transaminase activity
NP_999092.1	77	aspartate cytoplasmic	413	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism	
								GO: pyridoxal phosphate binding; identical protein binding; L-phenylalanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity; fatty acid homeostasis; L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity; glycerol biosynthetic process; aspartate biosynthetic process; L-cysteine:2-oxoglutarate aminotransferase activity; aspartate catabolic process; cellular response to insulin stimulus; nucleus; oxaloacetate metabolic process; extracellular exosome; Notch signaling pathway; glutamate catabolic process to 2-oxoglutarate; mitochondrion; glutamate catabolic process to aspartate; response to glucocorticoid; phosphatidylserine decarboxylase activity; cytosol
NP_999074.1	52	glutamine synthetase isoform x1	373	-	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism	
								GO: cell proliferation; identical protein binding; myelin sheath; glutamate decarboxylase activity; glutamine biosynthetic process; cellular response to starvation; glutamate-ammonia ligase activity; glial cell projection; nucleus; ATP binding; response to glucose; extracellular exosome; mitochondrion; cell body
XP_003125488.2	51	alanine aminotransferase 1	555	s	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism	
								GO: pyridoxal phosphate binding; extracellular exosome; cytoplasm; L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity; biosynthetic process; L-alanine catabolic process
XP_001928380.1	37	acetyl- cytosolic	397	-	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation	
								GO: acetyl-CoA C-acetyltransferase activity; extracellular exosome; cytoplasm; metabolic process; nucleolus; nucleoplasm
XP_003135174.1	36	3-hydroxyacyl- dehydrogenase type-2	261	-	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation	
								GO: 3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase activity; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity; tRNA processing; testosterone dehydrogenase [NAD(P)] activity; endoplasmic reticulum; oxidation-reduction process; mitochondrial inner membrane; mitochondrial nucleoid; poly(A) RNA binding
NP_001161110.1	28	trifunctional enzyme subunit mitochondrial	397	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation	
								GO: extracellular exosome; acetyl-CoA C-acyltransferase activity; long-chain-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity; endoplasmic reticulum; oxidation-reduction process; mitochondrial outer membrane; mitochondrial nucleoid; poly(A) RNA binding
NP_001011727.1	20	adenosylhomocysteinase	432	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism	
								GO: extracellular exosome; S-adenosylmethionine cycle; melanosome; cytosol; adenosylhomocysteinase activity; one-carbon metabolic process
NP_001038076.1	19	retinal dehydrogenase 2 isoform x3	521	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation	

								GO: neural tube development; response to cytokine; midgut development; negative regulation of cell proliferation; positive regulation of cell proliferation; anterior/posterior pattern specification; retinol metabolic process; retinal metabolic process; cardiac muscle tissue development; face development; determination of bilateral symmetry; proximal/distal pattern formation; heart morphogenesis; retinoic acid receptor signaling pathway; blood vessel development; embryonic digestive tract development; kidney development; hindbrain development; liver development; cytosol; morphogenesis of embryonic epithelium; embryonic forelimb morphogenesis; lung development; pancreas development; ureter maturation; neural crest cell development; neuron differentiation; embryonic camera-type eye development; 9-cis-retinoic acid biosynthetic process; retinal binding; vitamin A metabolic process; pituitary gland development; aldehyde dehydrogenase (NAD) activity; 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase activity; perinuclear region of cytoplasm; cellular response to retinoic acid; positive regulation of gene expression; retinal dehydrogenase activity; positive regulation of apoptotic process; response to estradiol; regulation of endothelial cell proliferation; oxidation-reduction process; response to vitamin A
NP_999103.1	19	succinyl- :3-ketoacid coenzyme a transferase mitochondrial	520	m	yes	outside	valine, leucine and isoleucine degradation	GO: 3-oxoacid CoA-transferase activity; protein homodimerization activity; ketone catabolic process; mitochondrion; ketone body catabolic process
XP_005656458.1	14	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	457	-	no	Inside TMhelix	valine, leucine and isoleucine degradation	GO: aldehyde dehydrogenase (NAD) activity; brown fat cell differentiation; extracellular exosome; methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating) activity; integral component of membrane; valine catabolic process; oxidation-reduction process; thymine catabolic process; malonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating) activity; nucleoplasm; poly(A) RNA binding
XP_001928714.1	14	arginase- mitochondrial	354	m	no	outside	arginine biosynthesis	GO: arginine metabolic process; metal ion binding; ureteric bud development; urea cycle; mitochondrion; arginase activity; striated muscle contraction
XP_005670765.1	11	short-chain specific acyl- mitochondrial	376	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation	GO: acyl-CoA dehydrogenase activity; nucleus; fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase; mitochondrial matrix; fatty-acyl-CoA binding; flavin adenine dinucleotide binding; butyryl-CoA dehydrogenase activity; electron carrier activity; lipid homeostasis; butyrate catabolic process
XP_003482212.1	8	glutamate--cysteine catalytic subunit	ligase 641	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism	GO: glutathione derivative biosynthetic process; negative regulation of neuron apoptotic process; magnesium ion binding; ATP binding; response to oxidative stress; glutamate metabolic process; response to heat; apoptotic mitochondrial changes; negative regulation of transcription, DNA-templated; protein heterodimerization activity; response to arsenic-containing substance; cytosol; response to nitrosative stress; glutamate binding; negative regulation of protein ubiquitination; regulation of mitochondrial depolarization; glutamate-cysteine ligase complex; glutathione biosynthetic process; cell redox homeostasis; ADP binding; cysteine metabolic process; response to hormone; glutamate-cysteine ligase activity; coenzyme binding; regulation of blood vessel size; xenobiotic metabolic process; negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway; L-ascorbic acid metabolic process; positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process

XP_005660857.1	8	isoaspartyl peptidase asparaginase	l- 308	-	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism
		GO: nucleus; cytoplasm; proteolysis; asparagine catabolic process via L-aspartate; asparaginase activity; beta-aspartyl-peptidase activity					
NP_001038050.1	7	cystathionine gamma-lyase	405	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism
		GO: pyridoxal phosphate binding; hydrogen sulfide biosynthetic process; positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling; L-cysteine desulfhydrase activity; protein sulfhydration; cystathionine gamma-lyase activity; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; nucleoplasm; calmodulin binding; extracellular exosome; protein homotetramerization; cytoplasm; protein-pyridoxal-5-phosphate linkage via peptidyl-N6-pyridoxal phosphate-L-lysine; L-cystine L-cysteine-lyase (deaminating); cysteine biosynthetic process via cystathionine; negative regulation of apoptotic signaling pathway					
XP_005672216.1	6	carbamoyl-phosphate synthase	1445	-	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism
		GO: carbamoyl phosphate biosynthetic process; aspartate carbamoyltransferase activity; positive regulation of vasodilation; dihydroorotase activity; carbamoyl-phosphate synthase (ammonia) activity; glutamine metabolic process; carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing) activity; glycogen catabolic process; nitric oxide metabolic process; mitochondrial nucleoid; modified amino acid binding; ATP binding; 'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process; arginine biosynthetic process; metal ion binding; urea cycle; response to lipopolysaccharide; triglyceride catabolic process; homocysteine metabolic process					
NP_999570.1	6	methylmalonyl- mitochondrial	750	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation
		modified amino acid binding; mitochondrial matrix; metal ion binding; cobalamin binding; post-embryonic development; methylmalonyl-CoA mutase activity; homocysteine metabolic process					
XP_005657252.1	4	methylglutaconyl- mitochondrial isoform x1	366	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation
		GO: methylglutaconyl-CoA hydratase activity; metabolic process; enoyl-CoA hydratase activity; mRNA 3'-UTR binding					
NP_001161122.1	4	s-adenosylmethionine synthase isoform type-2	395	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism
		GO: response to cAMP; S-adenosylmethionine biosynthetic process; circadian rhythm; response to hormone; methionine adenosyltransferase activity; one-carbon metabolic process; ATP binding; protein binding; methionine adenosyltransferase complex; metal ion binding; response to drug; xenobiotic metabolic process; cytosol; amino acid binding; methylation					
XP_005656108.1	3	hydroxymethylglutaryl- mitochondrial isoform x1	333	m	no	outside	valine, leucine and isoleucine degradation
		GO: magnesium ion binding; peroxisome; protein homodimerization activity; mitochondrial matrix; protein tetramerization; hydroxymethylglutaryl-CoA lyase activity; manganese ion binding; ketone body biosynthetic process; receptor binding; mitochondrial inner membrane; mitochondrion organization					
NP_999061.1	3	aminoacylase-1 isoform x1	407	-	no	outside	arginine biosynthesis
		GO: cytoplasm; metal ion binding; proteolysis; cellular amino acid metabolic process; aminoacylase activity; metallopeptidase activity					
XP_005672094.1	3	glutaminase kidney mitochondrial isoform x3	381	-	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism

							GO: glutaminase activity; protein binding; glutamate biosynthetic process; protein homotetramerization; mitochondrial matrix; suckling behavior; synaptic transmission; regulation of respiratory gaseous exchange by neurological system process; glutamine catabolic process
XP_005672470.1	2	alanine--glyoxylate aminotransferase isoform x1	480	m	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism
							GO: pyridoxal phosphate binding; identical protein binding; L-alanine catabolic process, by transamination; positive regulation of nitric oxide biosynthetic process; glycine biosynthetic process, by transamination of glyoxylate; mitochondrion; (R)-3-amino-2-methylpropionate-pyruvate transaminase activity; alanine-glyoxylate transaminase activity; glyoxylate catabolic process
XP_003124491.1	2	argininosuccinate lyase	464	-	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism
							GO: locomotory behavior; urea cycle; protein tetramerization; post-embryonic development; arginine biosynthetic process via ornithine; cytosol; argininosuccinate lyase activity; ammonia assimilation cycle
XP_005654887.1	1	dna methyltransferase 1	(cytosine-5)- 1624	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism
							GO: gene silencing; chromatin modification; zinc ion binding; C-5 methylation of cytosine; transcription, DNA-templated; chromatin binding; transcription factor binding; methyl-CpG binding; pericentric heterochromatin; regulation of cell proliferation; replication fork; negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; nucleus; DNA (cytosine-5-)-methyltransferase activity; cellular response to amino acid stimulus; RNA binding; negative regulation of histone H3-K9 methylation; positive regulation of gene expression; positive regulation of histone H3-K4 methylation; maintenance of DNA methylation
NP_001231430.1	1	glutamate dehydrogenase mitochondrial	558	m	no	outside	alanine, aspartate and glutamate metabolism
							GO: leucine binding; response to aluminum ion; glutamine metabolic process; glutamate dehydrogenase [NAD(P)+] activity; glutamate dehydrogenase (NAD+) activity; ADP binding; mitochondrial inner membrane; substantia nigra development; GTP binding; glutamate catabolic process; ATP binding; tricarboxylic acid metabolic process; glutamate biosynthetic process; mitochondrial matrix; oxidation-reduction process; positive regulation of insulin secretion; NAD+ binding; enzyme binding
NP_001231554.1	1	glutathione synthetase	474	-	no	outside	cysteine and methionine metabolism
							GO: magnesium ion binding; ATP binding; extracellular exosome; protein homodimerization activity; glutathione binding; glutathione biosynthetic process; response to cadmium ion; glutathione synthase activity

Apêndice D - Proteínas relacionadas com metabolismo de esteroides. As proteínas são apresentadas com informações obtidas por análise de bioinformática.

Número de acesso	Spectral counts	Nome da proteína	Comprimento (aa)	TargetP	SignalP	TMHMM	Rota metabólica
NP_001001539.1	151	aldose reductase GO: extracellular exosome; cytoplasm; alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity; daunorubicin metabolic process; 17-alpha,20-alpha-dihydroxypregn-4-en-3-one dehydrogenase activity; oxidation-reduction process; glyceraldehyde oxidoreductase activity; doxorubicin metabolic process; nucleoplasm	316	-	no	outside	steroid hormone biosynthesis
XP_003135174.1	36	3-hydroxyacyl- dehydrogenase type-2 GO: 3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase activity; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity; tRNA processing; testosterone dehydrogenase [NAD(P)] activity; endoplasmic reticulum; oxidation-reduction process; mitochondrial inner membrane; mitochondrial nucleoid; poly(A) RNA binding	261	-	no	outside	steroid degradation, steroid hormone biosynthesis
XP_005666285.1	17	dehydrogenase reductase sdr family member 4 isoform x1 GO: carbonyl reductase (NADPH) activity; peroxisome; 3-keto sterol reductase activity; mitochondrion; retinal dehydrogenase activity; retinal metabolic process; oxidation-reduction process	278	m	no	outside	steroid biosynthesis
XP_005674022.1	5	sterol-4-alpha-carboxylate 3- decarboxylating GO: endoplasmic reticulum membrane; lipid particle; 3-beta-hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase activity; hair follicle development; labyrinthine layer blood vessel development; sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase (decarboxylating) activity; integral component of membrane; cholesterol biosynthetic process; smoothened signaling pathway; oxidation-reduction process	370	-	no	outside	steroid biosynthesis, steroid degradation, steroid hormone biosynthesis
NP_001116606.1	1	lysosomal acid lipase cholesteryl ester hydrolase GO: cell proliferation; cell morphogenesis; sterol esterase activity; fatty acid metabolic process; lysosome; tissue remodeling; inflammatory response; extracellular exosome; homeostasis of number of cells within a tissue; lipid catabolic process; cytokine production; sterol metabolic process; lung development	399	s	yes	outside	steroid biosynthesis