

TATIANA PRATA MENEZES

MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E PROTEÔMICA EPIDIDIMÁRIA DO
ROEDOR SILVESTRE *Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA, CRICETIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Menezes, Tatiana Prata, 1987-

M543m Morfologia, morfometria e proteômica epididimária do
2013 roedor silvestre *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae) /
Tatiana Prata Menezes. – Viçosa, MG, 2013.
vi, 65f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Roedor- Reprodução. 2. Reprodução. 3. Morfometria.
4. Células. 5. Reprodução animal. 6. Morfologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 599.35

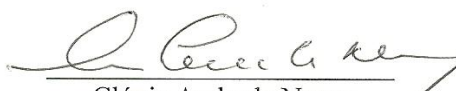
TATIANA PRATA MENEZES

MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E PROTEÔMICA EPIDIDIMÁRIA DO
ROEDOR SILVESTRE *Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA, CRICETIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2013.


Arlindo de Alencar A. N. Moura


Clóvis Andrade Neves


Mariana Machado Neves
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família:

À minha mãe, minha maior inspiração e minha maior saudade, por ter me ensinado a correr atrás dos meus sonhos. Ela é a principal responsável por minha caminhada nessa vida.

Ao meu pai, José, e meus irmãos, Thiago e Ítalo, por serem a minha base. Sem vocês essa conquista não seria possível. Obrigada por terem me apoiado e incentivado em todos os momentos. Amo vocês!

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas, que mesmo longe, foram grandes incentivadores da minha caminhada.

À Nati, Gilda e Grazi, pela amizade. Saiba que nossa convivência foi um presente, o laço que criamos foi fundamental nessa caminhada. Nós formamos uma verdadeira família durante esses anos, dividimos alegrias e tristezas, aprendemos muito juntas. Como diria Roberto Carlos: “foram tantas emoções”. Obrigada por tudo, meninas! Amo vocês!

Agradeço à minha orientadora, Mariana Neves, pela amizade, incentivo e confiança. Seus ensinamentos foram fundamentais. Obrigada por TUDO!

Ao professor Sérgio da Matta, por ter confiado em mim e me incentivado. Você foi uma das pessoas que não me deixou desistir e acreditou que eu conseguiria chegar até aqui. Obrigada pelas palavras ditas, pelo apoio e pelos ensinamentos!

As amigas conquistadas: Viviane, Camila, Priscila, Emerson, Susana, Rafael R., Nayara, Jerusa e Rafael B. Obrigada pela amizade, apoio, troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração. Vocês foram fundamentais nessa caminhada.

Aos meus amigos (as) de longas datas: Diogo, Luciano, Guilherme, Lívia, Paola, por entenderem minha ausência e por estarem comigo em todos os momentos.

Aos colegas do laboratório de Biologia Estrutural: Alex, Marli, Arlete, Lilian, Bruna, Kyvia, Ana Paula, Daiane, Ana Carolina Maytê e Suellen, pela convivência harmoniosa e constantes ajudas.

Aos professores do departamento de Biologia Geral, pelos ensinamentos, lições e ajuda.

Agradeço a Beth, secretária do programa de Biologia Celular e Estrutural, pela eficiência, ajuda e alegria de sempre.

Aos funcionários do prédio da Biologia, pela educação e alegria.

Ao professor Arlindo e seus orientados (as), que me acolheram com todo carinho na Universidade Federal do Ceará (UFC), obrigada pela ajuda e apoio, cedendo o espaço, matéria-prima e equipamentos, além da troca de conhecimentos.

À Universidade de Fortaleza (UNIFOR), por ter cedido seu espaço, matéria-prima e equipamentos para que eu pudesse realizar parte do meu experimento.

À professora Sylvie Breton, por ter contribuído para esse trabalho e fornecido apoio, cedendo à estrutura do seu laboratório, matéria-prima e equipamentos para realização de uma parte do experimento.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao programa de Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de realização do curso e crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de pesquisa, possibilitando a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro a eventos científicos.

OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Roedores Silvestres.....	3
2.2. Epidídimo.....	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
ARTIGO.....	11
MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E PROTEÔMICA EPIDIDIMÁRIA DO ROEDOR SILVESTRE <i>Oligoryzomys nigripes</i> (RODENTIA, CRICETIDAE).....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1. Local e métodos de captura dos animais silvestres.....	13
2.2. Eutanásia e coleta dos epidídimos.....	14
2.3. Processamento do material para microscopia de luz.....	14
2.4. Morfometria epididimária.....	15
2.5. Processamento histológico para microscopia de fluorescência e confocal.....	16
2.6. Proteômica.....	17
2.6.1. Coleta do material.....	17
2.6.2. Digestão das amostras.....	18
2.6.3. Identificação das proteínas.....	18
2.7. Análise estatística.....	20
3. RESULTADOS.....	20
3.1. Avaliação morfológica das regiões epididimárias.....	20
3.2. Histomorfometria epididimária.....	22
3.3. Imunofluorescência.....	24
3.4. Proteômica.....	27
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÕES.....	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXO 1: Preparo da solução de Karnovsky.....	54
ANEXO 2: Preparo do fixador paraformaldeído-lisina-periodato (PLP).....	54
ANEXO 3: Azul de toluidina-borato de sódio 1%.....	54
ANEXO 4: Proteins detected by shotgun proteomics (LC-ESI-MS/MS) in different regions of the epididymis of <i>Oligoryzomys nigripes</i> of Minas Gerais state. Protein searches were run using the Protein Lynx Global Server (v. 2.4) against Rodentia entries of the Swissprot database.....	55

RESUMO

MENEZES, Tatiana Prata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Morfologia, morfometria e proteômica epididimária do roedor silvestre *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae)**. Orientadora: Mariana Machado Neves.

Ecossistemas brasileiros, como a Mata Atlântica, têm sofrido com a destruição e contaminação ambiental, principalmente quando envolvem a presença de substâncias que agem como disruptores endócrinos. O conhecimento de aspectos reprodutivos de roedores silvestres é importante para o monitoramento ambiental, pois órgãos genitais, como o epidídimo, são indicadores da presença destas substâncias por ser andrógeno-dependente. Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar o epidídimo de animais da espécie *Oligoryzomys nigripes* segundo parâmetros morfológicos e expressão de proteínas no seu fluido. Para isso utilizou-se 16 animais coletados em um fragmento de Mata Atlântica, situado na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) – Rubens Rezende Fontes, localizado no município de Viçosa-MG. Os roedores foram eutanasiados e seus epidídimos coletados, sendo destinados à microscopia de luz (n=7), imunofluorescência (n=6) e proteômica (n=3). Na microscopia de luz, observou-se que o epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* possui cinco regiões bem delimitadas por septos de tecido conjuntivo, denominadas de segmento inicial, cabeça, corpo, cauda proximal e cauda distal. Através da morfometria pode-se ver que há maior proporção de epitélio em todas as regiões e que os diâmetros tubular e luminal variam pouco entre elas, exceto na cauda distal que possui maior proporção de lúmen com espermatozoide e maiores diâmetros. Na imunofluorescência, a marcação para aquaporina 9 mostrou que essa estava abundantemente expressa na superfície apical das células principais ao longo do epidídimo. As células claras foram identificadas com a marcação para ATPase H^+ vacuolar, presente nas suas vesículas subapicais e microvilosidades. A marcação positiva para queratina 5 foi observada no citoplasma e na membrana das células basais, destacando alguns prolongamentos direcionados para o lúmen do epidídimo e muitas projeções laterais na base do epitélio. Na proteômica foram identificadas diversas proteínas, sendo algumas estruturais, de defesa e com ação na maturação do espermatozoide, entre outras. Pode-se concluir que, apesar da semelhança com outros roedores, o epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* possui aspectos diferenciados. Por isso, o estudo descritivo do epidídimo é extremamente importante, visto que esses animais estão em um ambiente que vem sofrendo constantes alterações que podem causar prejuízos no seu processo reprodutivo.

ABSTRACT

MENEZES, Tatiana Prata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2013. **Morphology, morphometry and proteomic analysis of epididymis from wild rodent *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae).** Adviser: Mariana Machado Neves.

Brazilian ecosystems, such as the Atlantic Forest, have suffered from the destruction and environmental contamination mainly when they involve the presence of substances that act as endocrine disruptors. Knowledge of reproductive aspects of wild rodents is important for environmental monitoring, as genital organs, as the epididymis, are indicators of the presence of these substances for being androgen-dependent. Therefore, this study aimed to characterize the epididymis of the species animal *Oligoryzomys nigripes* second parameters morphological and protein expression in its fluid. For this we used 16 animals collected in a fragment of Atlantic Forest, located in the Private Reserve of Natural Heritage (PRNP) - Rubens Rezende Fontes, located in Viçosa-MG. The rodents were euthanized and their epididymides collected, being intended for light microscopy (n = 7), immunofluorescence (n = 6) and proteomics (n = 3). In light microscopy, it was observed that epididymal of *Oligoryzomys nigripes* has five regions well delimited by septa of connective tissue, called the initial segment, caput, corpus, cauda proximal and distal cauda. Through the morphology can be seen that there is a greater proportion of epithelium in all regions, and that the tubular and luminal diameter vary little between them, except in the distal tail has a larger proportion of sperm in lumen and larger diameters. In immunofluorescence labeling for aquaporin 9 showed that this was abundantly expressed on the apical surface the principal cells along of the epididymis. The clear cells were identified with the markup for vacuolar H⁺ ATPase, present in their subapical vesicles and microvilli. The positive staining for keratin 5 was observed in the cytoplasm and the membrane of the basal cells, highlighting some extensions directed towards the lumen of the epididymis and many lateral projections at the base of the epithelium. In proteomics were identified several proteins, some of which are structural, defensive and action on the maturation of sperm, among others. It can be concluded that, despite the similarity with other rodents, the epididymis *Oligoryzomys nigripes* has different aspects. Therefore, the descriptive study of the epididymis is extremely important, since these animals are in an environment that is undergoing constant changes that can cause damage to your reproductive process.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os ecossistemas brasileiros estão passando por um acelerado processo de fragmentação, sendo esta fragmentação reconhecida como uma das principais ameaças à biodiversidade. A rapidez da destruição, aliada à grande riqueza biológica, têm colocado as florestas tropicais no centro das atenções conservacionistas. Algumas florestas podem abrigar boa parte das espécies biológicas brasileiras, ocupando apenas 7% da superfície terrestre do país. Atualmente, várias dessas espécies ainda são quase que completamente desconhecidas para a ciência e estão representadas por pequenos conjuntos de populações isoladas (Cox et al., 2003; Rambaldi, 2003).

Pequenos roedores silvestres, como o *Oligoryzomys nigripes*, são considerados indicadores da dinâmica das florestas Neotropicais e de alterações locais do habitat e da paisagem, por serem predadores e dispersores de sementes. Conhecer o comportamento reprodutivo de pequenos roedores e entender o funcionamento dos seus principais órgãos, testículos e epidídimos, se torna essencial para a compreensão dos processos histofisiológicos reprodutivos. A habilidade reprodutiva dos machos sexualmente maduros depende da capacidade dos testículos em produzir grande número de espermatozoides viáveis e concentrações adequadas de andrógenos para libido e manutenção de órgãos genitais, incluindo o epidídimo (Gier e Marion, 1970). É no epidídimo que os espermatozoides passam pelo processo de maturação espermática, que envolve modificações bioquímicas e funcionais da membrana, culminando com a aquisição da motilidade e da capacidade fecundante. Após esse processo, eles continuam estocados na cauda do epidídimo até serem liberados na ejaculação (Orgebin-Crist, 1969; Robaire e Viger, 1995; Cooper, 2007).

Com base no presente exposto, este trabalho teve como objetivo geral descrever a histofisiologia epididimária da espécie *Oligoryzomys nigripes*, endêmica da Mata Atlântica, enfocando parâmetros morfológicos e funcionais. Os objetivos específicos estabelecidos foram:

- Analisar as características morfológicas do epidídimo desta espécie macroscopicamente, quanto a parâmetros biométricos, e microscopicamente, considerando a morfologia e histomorfometria das principais regiões deste órgão, utilizando microscopia de luz;
- Caracterizar a presença de proteínas marcadoras do epidídimo para as células principais, basais e claras, utilizando microscopia de fluorescência e confocal;

- Identificar e descrever as proteínas presentes no fluido epididimário de cada região, através da técnica do *shotgun*, e, através dos bancos de dados, agrupá-las de acordo com a ontologia gênica e interações com outras proteínas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Roedores Silvestres

A Mata Atlântica é o segundo maior bioma brasileiro em diversidade de espécies de mamíferos, no qual 30% são endêmicos (Paglia et al., 2012). Dentre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica possui a maior abundância de espécies de roedores que atuam como dispersoras de sementes e plântulas, sendo importantes indicadores da qualidade ambiental por influenciarem na dinâmica das florestas (Fonseca, 1989; Sánchez-Cordero e Martinez-Gallardo, 1998; Pardini e Umetsu, 2006; Paglia et al., 2012).

A densidade populacional destas espécies de roedores reflete diretamente na estrutura do bioma. Isso porque os roedores são considerados presas, de acordo com os níveis tróficos da cadeia alimentar, e a sua abundância contribui para uma maior ou menor população de predadores (Taylor, 1927; Terborgh, 1988).

A ordem Rodentia possui 34,7% do número de espécies dentre as ordens brasileiras (Paglia et al., 2012). Nela está inserida a família Cricetidae, que agrupa 55% das espécies de roedores da América do Sul, que somada à subfamília Sigmodontinae possui um marcado endemismo local. Das 270 espécies viventes desta subfamília, incluindo as formas que habitam as Américas do Sul, Central e do Norte, 249 vivem no território sulamericano, sendo 235 endêmicas desse continente (Reig, 1984).

Segundo Reig (1984), os Sigmodontinos possuíram um ancestral relativamente antigo na fauna sulamericana que teriam se diferenciado em diferentes episódios cladogênicos locais. A partir de uma linhagem ancestral, eles teriam se incorporado a América do Sul pelo extremo noroeste, tendo origem norte-americana. Nesse momento, deu-se início a uma diferenciação local ativa para distintos tipos de habitats e formas de vida, no qual está relacionado a um longo processo adaptativo/evolutivo que as espécies passaram.

A distribuição taxonômica dessa subfamília foi baseada em vários aspectos comparativos, como padrões musculares, diferenças na anatomia da glândula peniana e acessórias, morfologia estomacal, microestrutura do pêlo, parasitas, biogeográfica, morfologia crânio-dentária e cromossômica (Reig, 1984).

As espécies do gênero *Oligoryzomys* pertencem à subfamília Sigmodontinae e possuem corpo pequeno e cauda longa, que pode chegar até duas vezes o tamanho do

seu corpo. Os animais possuem hábito noturno e estão adaptados a viver no chão, mas conseguem escalar árvore. Sua dieta é diversificada, podendo alimentar-se de frutas, sementes, grãos e insetos (Carleton e Musser, 1989; Vieira et al., 2003; Gonzalez-Ittig et al., 2010).

2.2. Epidídimo

O epidídimo é um órgão que compõe o aparelho reprodutor masculino e é altamente regulado por andrógenos, que mantêm sua estrutura e função. Sabe-se que esses hormônios regulam a transcrição gênica e a secreção de proteínas, influenciando diretamente na composição do fluido epididimário e conseqüentemente a qualidade espermática (Robaire e Viger, 1995; Primiani et al., 2007; Hamzeh e Robaire, 2009).

Receptores para andrógenos são encontrados em todo o epitélio epididimário, onde a testosterona é a mais ativa, atuando também quando na forma reduzida 5α -dihidrotestosterona. Sua ação pode ser pela circulação sanguínea e pela ação direta vinda do fluido testicular (Robaire et al., 2007).

O epidídimo é constituído por um epitélio pseudoestratificado que apresenta baixa taxa de renovação e é contornado por uma membrana limitante que serve de apoio para as células ali presentes. Os tipos celulares mais comuns no epidídimo são as células principais, basais, estreitas e claras (Clermont e Flannery, 1970; Cheung et al., 2005; Robaire et al., 2006). As células principais e basais são encontradas em toda a extensão do ducto epididimário, enquanto que as estreitas somente no segmento inicial e a clara na cabeça, corpo e cauda (Shum et al., 2009).

As funções de cada tipo celular ainda têm sido pesquisadas. Sabe-se que as células principais são fundamentais na secreção de substâncias que compõe o fluido epididimário, realizando secreção de moléculas orgânicas pequenas, síntese e secreção de proteínas, água, íons e lipídios (Robaire e Hermo, 1988; Primiani et al., 2007). A aquaporina 9 é uma proteína transmembrana presente na superfície apical das células principais envolvida no transporte de água e outros solutos (Agré et al., 1995; Pastor-Soler et al., 2001).

As células claras são responsáveis pela acidificação do fluido, que é o principal fator responsável pela manutenção dos espermatozoides em estado quiescente (Cooper, 2007; Shum et al., 2009). Na membrana dessas células está localizada a ATPase H^+ vacuolar (V-ATPase), que é uma bomba de prótons dependente de ATP (Breton et al.,

1996; Pietrement et al., 2006; Saroussi e Nelson, 2009). Ela é composta por diversas subunidades e isoformas, além de apresentar domínios distintos que se localizam na porção citosólica das células e atravessam a membrana plasmática (Shum et al., 2009).

As células basais atuam sobre as células principais e as claras regulando suas funções, através do controle do transporte de água nas células principais e de eletrólitos nas células claras, por meio de fatores parácrinos (Leung et al., 2004; Cheung et al., 2005). Essas células possuem prolongamentos que se estendem até o lúmen do epidídimo e detectam a angiotensina II, que desencadeia reação nas outras células por meio do contato mantido por prolongamentos laterais das células basais projetados ao longo da membrana basal (Shum et al., 2008; Shum et al., 2011). Já as células estreitas estão envolvidas na degradação de proteínas luminais, principalmente daquelas vindas do testículo e que não são mais necessárias (Adamali e Hermo, 1996).

Formado por um ducto único, alongado e altamente contorcido, o epidídimo possui septos de tecido conjuntivo que são projetados para o interior do órgão, dividindo-o anatomicamente em segmentos (Robaire e Viger, 1995; Toshimori, 1998; Robaire e Hinton, 2002; Primiani et al., 2007). Esses segmentos variam de acordo com a espécie estudada, apresentando geralmente quatro regiões denominadas de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Sullivan et al., 2005; Robaire et al., 2006; Hamzeh e Robaire, 2009). Diferenças morfológicas baseadas nos diâmetros tubular e luminal e altura do epitélio são vistas entre os segmentos, além de diferenças funcionais como limitação da expressão gênica e restrição do transito de moléculas entre eles (Cornwall e Hann, 1995; Takano, 2007; Turner et al., 2003; 2007).

O segmento inicial é responsável por fazer a troca do fluido que acompanha os espermatozoides vindos dos testículos, assim como secretar novas substâncias. As regiões da cabeça e corpo são as que mais sintetizam e secretam substâncias, chegando a 80% dos componentes do fluido. Por sua vez, a cauda é o local onde ocorre a manutenção dos componentes do fluido epididimário, no qual continua ocorrendo a troca ativa de substâncias (Robaire e Viger, 1995; Gatti et al., 2004).

Funcionalmente, o epidídimo é um importante órgão do aparelho reprodutor masculino. É nele que ocorrem os processos responsáveis pelo estabelecimento da fertilidade masculina. Ele é o responsável pelo transporte, armazenamento e maturação dos espermatozoides (Orgebin-Crist, 1969; Robaire e Viger, 1995; Jones, 1999; Sullivan et al., 2005; Shum et al., 2009).

A maturação espermática é definida pela aquisição da capacidade fertilizante do gameta masculino, onde o espermatozoide passa por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. É através dessas alterações que o espermatozoide ganha a motilidade progressiva e capacidade de reconhecer e se ligar a zona pelúcida do gameta feminino. O armazenamento é uma característica adaptativa, que garante quantidade e qualidade de espermatozoides em um ejaculado suficiente para fecundar o ovócito (Orgebin-Crist, 1969; Toshimori, 1998; Cooper e Yeung, 2003; Gatti et al., 2004; Sullivan et al., 2005; Cooper, 2007; Jones et al., 2007).

Durante o trânsito do espermatozoide pelo epidídimo ocorre o contato com um ambiente luminal que atua de diversas formas sobre os espermatozoides e previne sua ativação prematura, mantendo-os em estado de dormência (Sullivan et al., 2005; Shum et al., 2009). Para isso, o fluido epididimário possui diversos constituintes, entre eles íons, proteínas e moléculas, orgânicas e inorgânicas (Robaire e Hermo, 1988; Cooper, 2007).

As proteínas do fluido atuam de diferentes formas e cada região realiza a secreção de um determinado grupo de proteínas, mudando a composição e as características do fluido (Robaire e Viger, 1995). Algumas proteínas secretadas são responsáveis por funções como proteção antimicrobiana e alteração da membrana plasmática do espermatozoide, para proporcionar revestimento e/ou modificações relacionadas à maturação (Dacheux et al., 2003; Gatti et al., 2004; Sullivan et al., 2005).

O microambiente luminal e a integridade das proteínas são mantidos principalmente por dois fatores. Uma é a barreira hematoepididimária, formada entre as células do epitélio através das junções celulares, que atuam regulando a passagem de moléculas e células, mantendo os espermatozoides protegidos da reação do sistema imunológico, bem como garantindo a manutenção dos componentes do fluido (Cyr et al., 2007; Primiani et al., 2007). Outro fator são os estereocílios presentes nas células principais, que proporcionam uma maior superfície de contato da célula com o ambiente luminal, permitindo a interação das moléculas com as bombas de membrana, canais iônicos e sistemas transportadores, mantendo o volume adequado de fluido, assim como o pH (Primiani et al., 2007).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMALI, HI; HERMO, L. 1996. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *Journal of Andrology*, vol. 17, nº. 3, May/June.

AGRE, P; BROWN, D; NIELSEN, S. 1995. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol.*, Aug; 7(4): 472-83.

BRETON, S; SMITH, PJ; LUI, B; BROWN, D. 1996. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med.*, Apr; 2(4): 470-2.

CARLETON, MD; MUSSER, GG. 1989. Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae, Sigmodontinae): a synopsis of microrozomys. *American Museum of Natural History*. Issued December 28, nº. 191.

CHEUNG, K-H; LEUNG, GPH; LEUNG, MCT; SHUM, WWC; ZHOU, W-L; WONG, PYD. 2005. Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *Journal of General Physiology*, vol. 125, May, 443-454.

CLERMONT, Y; FLANNERY, J. 1970. Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. *Biology of reproduction*, 3, 283-292.

COOPER, TG. 2007. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology*, 9 (4): 533-539.

COOPER TG; YEUNG, C-H. 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microscopy Research and Technique*, 61: 28-38.

CORNWALL, GA; HANN, SR. 1995. Specialized gene expression in the epididymis. *Journal of Andrology*, vol. 16, nº. 5.

COX, MP; DICKMAN, CR; HUNTER, J. 2003. Effects of rainforest fragmentation on non-flying mammals of the Eastern Dorrigo Plateau, Australia. *Biol. Conserv.*, 115: 175-189.

CYR, DG; GREGORY, M; DUBÉ, É; DUFRESNE, J; CHAN, PTK; HERMO, L. 2007. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Journal of Andrology*, 9 (4): 463–475.

DACHEUX, J-L; GATTI, JL; DACHEUX, F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique*, 61: 7–17.

FONSECA, GAB DA. 1989. Small mammal species diversity in Brazilian tropical primary and secondary forests of different sizes. *Revta bras. Zool.*, 6(3): 381 – 422.

GATTI, J-L; CASTELLA, S; DACHEUX, F; ECROYD, H; MÉTAYER, S; THIMON, V; DACHEUX, J-L. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, 82–83: 321–339.

GIER, HT; MARION, GB. 1970. Development of the mammalian testis. In: *The Testis*, vol. 1, pp. 1-45. Academic Press, New York.

GONZÁLEZ-ITTIG, R; SALAZAR-BRAVO, J; BARQUEZ, RM; GADERNAL, CN. 2010. Phylogenetic relationships among species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) from Central and South America. *Zoologica Scripta*, n°. 39, vol. 6, November, pp. 511–526.

HAMZEH, M; ROBAIRE, B. 2009. Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal of Andrology*, vol. 30, n°. 2, March/April.

JONES, RC. 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *International Journal of Andrology*, 22: 57-67.

JONES, RC; DACHEUX, J-L; NIXON, B; ECROYD, HW. 2007. Role of the epididymis in sperm competition. *Asian Journal of Andrology*; 9 (4): 493–499.

LEUNG, GP; CHEUNG, KH; LEUNG, CT; TSANG, MW; WONG, PY. 2004. Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol.*, Mar 15; 216(1-2): 5-13.

ORGBIN-CRIST, M-C. 1969. Studies on the function of the epididymis. *Biology of Reproduction*, 1: 155-175.

PAGLIA, AP; FONSECA, GAB DA; RYLANDS, AB; HERRMANN, G; AGUIAR, LMS; CHIARELLO, AG; LEITE, YLR; COSTA, LP; SICILIANO, S; KIERULFF, MCM; MENDES, SL; TAVARES, V DA C; MITTERMEIER, RA; PATTON JL. 2012. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Edição/2nd Edition. *Occasional Papers in Conservation Biology*, nº. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76 pp.

PARDINI, R; UMETSU, F. 2006. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande – distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. *Biota Neotropica*, v. 6, nº. 2.

PASTOR-SOLER, N; BAGNIS, C; SABOLIC, I; TYSZKOWSKI, R; MCKEE, M; VAN HOEK, A; BRETON, S; BROWN, D. 2001. Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol Reprod.*, Aug; 65(2): 384-93.

PIETREMENT, C; SUN-WADA, G-H; DA SILVA, N; MCKEE, M; MARSHANSKY, V; BROWN, D; FUTAI, M; BRETON, S. 2006. Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biology of Reproduction*, 74: 185-194.

PRIMIANI, N; GREGORY, M; DUFRESNE, J; SMITH, CE; LIU, YL; BARTLES, JR; CYR, DG; HERMO, L. 2007. Microvillar Size and Espin Expression in Principal Cells

of the Adult Rat Epididymis Are Regulated by Androgens. *Journal of Andrology*, vol. 28, nº. 5, September/October.

RAMBALDI, DM. In: RAMBALDI, DM; OLIVEIRA, DAS. 2003. Fragmentação de ecossistemas - causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília: MMA/SBF.

REIG, AO. 1984. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroídeos sulamericanos (Cricetidae: Signodontinae). *Rev. Bras. Genet.* VII, 2, 333-365.

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

ROBAIRE, B; HINTON, BT. 2002. *The Epididymis: from molecules to clinical practice: a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis, and the vas deferens*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

ROBAIRE, R; HINTON, BT; ORGEBIN-CRIST, M-C. 2006. The epididymis. In: Knobil. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Cambridge: Elsevier, p. 1071-1148.

ROBAIRE, B; SEENUNDUN, S; HAMZEH, M; LAMOUR, S-A. 2007. Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian Journal of Andrology*; 9 (4): 545–553.

ROBAIRE, B; VIGER, RS. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction*, 52, 226-236.

SÁNCHEZ-CORDERO, V; MARTINEZ-GALLARDO, R. 1998. Post dispersal fruit and seed removal by forest dwelling rodents in a lowland rainforest in México. *J. Trop. Ecol.* 14: 139-151.

SAROUSI, S; NELSON, N. 2009. The little we know on the structure and machinery of V-ATPase. *J Exp Biol.*, Jun; 212(Pt 11): 1604-10.

SHUM, WWC; DA SILVA, N; BROWN, D; BRETON, S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 1753-1761.

SHUM, WWC; DA SILVA, N; MCKEE, M; SMITH, PJS; BROWN, D; BRETON, S. 2008. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*, 135, 1108–1117.

SHUM, WW; RUAN, YC; DA SILVA, N; BRETON, S. 2011. Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *J Androl.*, Nov-Dec; 32(6): 576-86.

SULLIVAN, R; SAEZ, F; GIROUARD, J; FRENETTE, G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35: 1 – 10.

TAKANO, H. 2007. Histological division of mouse epididymis based on regional differences. *Hirosaki Medical Journal*, 59 (suppl.): S292-S301.

TAYLOR, WP. 1927. The emergence of the biology of forest and range. *Science*, Vol. LXVI, n°. 1704.

TERBORGH, J. 1988. The big things that run the world - a sequel to E. O. Wilson. *Conserv. Biol.*, 2: 402-4038.

TOSHIMORI, K. 1998. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell and Tissue Research*, 293: 177-187.

TURNER, TT; BOMGARDNER, D; JACOBS, JP; NGUYEN, QAT. 2003. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*, 125, 871–878.

TURNER, TT; JOHNSTON, DS; JELINSKY, SA; TOMSIG, JL; FINGER, JN. 2007. Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. *Asian Journal of Andrology*; 9 (4): 565–573.

VIEIRA, EM; PIZO, MA; IZAR, P. 2003. Fruit and seed exploitation by small rodents of the Brazilian Atlantic forest. *Mammalia*, t. 67, n°. 4.

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas brasileiros estão passando por um acelerado processo de fragmentação (Rambaldi, 2003), sendo este processo reconhecido como a principal ameaça a biodiversidade de seus biomas. Ele causa diminuição na área de nicho das espécies, coloca animais domésticos em contato com as populações nativas e propicia a invasão de espécies exóticas, potencializando a contaminação humana, a dispersão de doenças e a extinção de espécies (Laurance e Bierregaard, 1997; Primack e Rodrigues, 2001; Cox et al., 2003). O principal agente causador dessa fragmentação é o homem, no qual pratica o desmatamento com finalidade de promover agricultura, pecuária, extração de madeira, entre outros (Campanili e Prochnow, 2006; Cáceres et al., 2008; Colombo e Joly, 2010).

A Mata Atlântica é um dos ecossistemas brasileiros mais ameaçados, o que causa preocupação devido ao fato de ser considerado o bioma com maior biodiversidade no mundo (MMA, 2001; Ribeiro et al., 2009; Canale et al., 2012). A sua dinâmica é em parte mantida por pequenos roedores. Eles contribuem para a regeneração e a manutenção da diversidade genética das populações de plantas, uma vez que são dispersores de sementes e polinizadores (Leite et al., 1994; Vieira, 1997; Cáceres et al., 1999; Carvalho et al., 1999; Cáceres, 2002; Cáceres et al., 2008). O gênero *Oligoryzomys*, que pertencem à subfamília Sigmodontinae, habitam a América do Sul e estão adaptados a diversas regiões, como área de floresta e de pasto baixo, alimentando-se de grãos, sementes, frutos e insetos (Reig, 1984; Reis et al., 2006).

O epidídimo é um órgão altamente andrógeno-dependente, responsável pelo processo de maturação espermática, que envolve a aquisição de motilidade e capacidade fecundante, e estocagem, mantendo-os quiescentes durante períodos prolongados (Cosentino e Cockett, 1986; Robaire e Hinton, 2002; Senger, 2003; Robaire et al., 2006; 2007). As células epididimárias são essenciais para a criação e manutenção de um microambiente luminal ideal para estes processos, entre elas as células principais, basais e claras (Pietrement et al., 2006; Robaire et al., 2006). Enquanto a primeira é responsável por secretar e absorver substâncias envolvidas nas modificações morfofuncionais dos espermatozoides com o auxílio de proteínas transmembranas,

como a aquaporina 9 (Agre et al., 1995; Pastor-Soler et al., 2001), as células claras trabalham na manutenção de um ambiente ácido que causa redução do metabolismo espermático, a partir da ação da ATPase H⁺ vacuolar (Breton et al., 1996; Shum et al., 2009). Já as células basais podem atuar regulando e integrando todas essas funções, ao manter contato com as demais células por meio de projeções citoplasmáticas (Serre e Robaire, 1998; Robaire e Hinton, 2002; Shum et al., 2009). As proteínas presentes no fluido luminal são responsáveis por modificações que ocorrem no espermatozoide durante o trânsito pelo epidídimo, como remodelação da membrana, além de algumas delas realizarem a proteção contra espécies reativas de oxigênio e microrganismos, entre outros (Fouchécourt et al., 2000; Dacheux et al., 2005).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o epidídimo de animais da espécie *Oligoryzomys nigripes* segundo parâmetros morfométricos, morfológicos e de expressão proteica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local e métodos de captura dos animais silvestres

Animais da espécie *Oligoryzomys nigripes* foram capturados na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) – Rubens Rezende Fontes, uma área de cerca de 10 hectares de Mata Atlântica que abriga o Centro de Biodiversidade da Mata Atlântica (BIOMA). Este centro é um espaço de pesquisa e educação ambiental em Biodiversidade e Biologia da Conservação, administrada pela Ambiente Brasil Centro de Estudos, conveniado com o Instituto Estadual de Florestas (IEF) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV). A RPPN está localizada no Município de Viçosa, na Zona da Mata Mineira (S 20°81' e W 42°85'). A captura e coleta dos roedores foram realizadas no ano de 2012, sob autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IBAMA; número processo 22289-1).

Os pontos de coleta foram estabelecidos em três tipos de áreas: pastagem, borda de mata e ao redor de lagoa, no qual foram dispostas armadilhas do tipo Sherman, Tomahawk e Pitfall. As armadilhas foram distribuídas em um total de 15 trilhas, na qual cada trilha continha cinco Pitfalls com guias de lona preta. Já as Sherman e Tomahawk totalizaram 100 armadilhas distribuídas aleatoriamente pela área de coleta.

As armadilhas continham como iscas frutas com farelo de milho e algodão embebido em óleo de fígado de bacalhau (Emulsão Scott[®]). Estas eram colocadas no final do dia, sendo verificada a presença de animais nas armadilhas no dia seguinte pela manhã. Os animais coletados foram devidamente identificados e posteriormente levados ao laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

2.2. Eutanásia e coleta dos epidídimos

No laboratório, os animais foram primeiramente pesados em balança de precisão 0,001g (BEL Engineering Mark160) para serem sedados e anestesiados, utilizando-se cloridrato de xilazina (10mg/kg/IM) e cloridrato de quetamina (150mg/kg/IM), aprofundando-se a anestesia até a eutanásia. Os procedimentos experimentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFV), sob número do processo 09/2012.

Após a abertura da cavidade abdominal, foram retirados os órgãos do aparelho reprodutor masculino para dissecação dos epidídimos. Estes foram pesados em balança de precisão 0,001g (BEL Engineering Mark 210A) para obtenção do seu peso absoluto e determinação do peso relativo segundo a fórmula:

$$\text{Peso relativo (g/100g)} = \frac{\text{peso do órgão (g)}}{\text{peso corporal do animal (g)}} \times 100$$

Logo em seguida, os epidídimos foram direcionados para avaliações em microscopia de luz (n=7 animais), no qual foram imediatamente imersos em fixador Karnovsky (Karnovsky, 1965; Anexo 1), e para microscopia de fluorescência (n=6 animais), os quais foram imediatamente fixados em paraformaldeído-lisina-periodato (PLP; Anexo 2), ambos por 24 horas. Para a proteômica (n=3 animais), foram utilizados os dois epidídimos conjuntamente e, ainda a fresco, foram segmentados em cabeça, corpo e cauda.

2.3. Processamento do material para microscopia de luz

Após a fixação em Karnovsky, os epidídimos inteiros foram desidratados em série de álcool etílico em concentrações crescentes (70, 80, 90% e absoluto), com

banhos de 30 minutos em cada. Em seguida, eles foram imersos em solução de glicol metacrilato (Historesin[®], Leica) usada, onde permaneceram *overnight* para a pré-infiltração, sendo transferidos para uma solução nova da resina para infiltração por duas horas. A blocagem dos fragmentos foi realizada através de imersão dos mesmos em solução de glicol metacrilato com o catalisador, peróxido de benzoila, sendo a forma de blocagem mantida em estufa a 37°C por 12h.

Cortes histológicos de 3µm de espessura foram obtidos utilizando-se navalha de vidro (*Leica Glass Strip*) acoplada no micrótomo rotativo (Leica RM2255) e montados em lâmina histológica. Estas lâminas foram coradas em solução de azul de toluidina - borato de sódio 1% (Anexo 3) e as lamínulas fixadas utilizando Entellan[®]. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio Olympus BX41 nos aumentos de 100, 200 e 400x. Os epidídimos foram avaliados qualitativamente, considerando a distribuição celular e as características histológicas de cinco regiões: segmento inicial, cabeça, corpo, cauda proximal e cauda distal.

2.4. Morfometria epididimária

Todas as análises morfométricas foram realizadas utilizando imagens histológicas capturadas utilizando o fotomicroscópio (Olympus BX50), com a objetiva de 20x, e analisadas com auxílio do programa Image Pro Plus 4.5 do Laboratório de Biologia Vegetal da UFV.

Para medir os diâmetros, tubular e luminal, das cinco regiões epididimárias, foram feitas mensurações, ao acaso, de 20 secções transversais do ducto epididimário que apresentaram contorno o mais circular possível. O diâmetro tubular foi calculado a partir da média de duas retas perpendiculares traçadas de um lado a outro do túbulo, tendo como limite a túnica própria. O diâmetro luminal foi obtido através do valor médio de duas retas perpendiculares traçadas considerando a superfície apical das células principais. As mesmas secções foram utilizadas para medir a altura do epitélio epididimário, que calculada com base na média de quatro mensurações opostas e traçadas da base da célula até seu ápice. Os resultados foram expressos em micrômetros (µm).

A proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular foi estimada utilizando-se uma grade com 266 intersecções (pontos) incidida sobre 10 imagens histológicas, obtidas na objetiva de 20x, o que totalizou 2660 pontos para cada região

analisada. Foram contabilizados os pontos coincidentes sobre elementos do compartimento tubular, epitélio, lúmen com espermatozoide, lúmen sem espermatozoide e túnica própria, e intertubular, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Os resultados foram expressos em porcentagem.

A frequência celular em cada região do epidídimo foi estimada a partir da contagem de células: principal, basal e clara, de cada túbulo, em um total de 10 secções transversais com o contorno o mais circular possível. Além disso, foi feita a mensuração de 10 núcleos de cada tipo celular por região epididimária, onde foram traçadas duas retas opostas e calculadas a média. Por fim, obtiveram-se as médias das contagens de células de cada região por animal, sendo aplicada a fórmula de correção de contagem celular, descrita por Amann (1962), para cada tipo celular:

$$\text{Número corrigido de células} = [\text{Número de células}] \left[\frac{\text{Espessura da secção}}{\text{Espessura da secção} + \sqrt{\left(\frac{\text{Diâmetro nuclear da célula}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{Diâmetro nuclear da célula}}{4}\right)^2}} \right]$$

Após a obtenção dos números corrigidos das células presentes no epitélio epididimário, foram obtidas as médias gerais por região, sendo os resultados finais expressos em percentual.

2.5. Processamento histológico para microscopia de fluorescência e confocal

Após as 24h de fixação no PLP, as amostras foram mantidas em PBS 0,01 M e refrigeradas até serem analisadas no Laboratório do Programa em Biologia das membranas, da Divisão de Nefrologia do *Center for Systems Biology* no Hospital Geral de Massachusetts, Escola de Medicina de Harvard.

Os epidídimos inteiros foram imersos em solução de sacarose a 30% *overnight*, sendo incluídos em meio de congelamento de tecidos *OCT Compound* (Tissue-Tek, Sakura Fine Technical Co., Torrance, CA) e blocados em moldes plásticos, para serem congelados e cortados em criostato (Leica CM3050-S, Leica Microsystems, Bannockburn, IL). Foram obtidos cortes histológicos de 5µm para montagem das lâminas.

Algumas lâminas foram coradas duplamente com anticorpos primários anti-aquaporina-9 (AQP9), marcador de células principais, e anti-ATPase H⁺ vacuolar tipo B1 (V-ATPase B1), marcador de células claras. O anticorpo primário anti-AQP9 foi

preparado na diluição 1:500, enquanto que o anticorpo anti-V-ATPase subunidade B1 foi preparado na diluição 1:300, sendo ambos diluídos em diluente de anticorpo (DAKO, Carpinteria, CA, USA) e aplicados *overnight*. As lâminas foram então lavadas duas vezes por 5 minutos em PBS 2,7% NaCl, para reduzir colorações inespecíficas, e uma vez em PBS. O anticorpo secundário para AQP9 (IgG anti-coelho acoplada a CY3; 1:400; Jackson Immunologicals, West Glove, PA) e para V-ATPase B1 (IgG anti-galinha acoplada a FITC; 1:30; Jackson Immunologicals) foi aplicada por 1 h em temperatura ambiente, seguido de três lavagens, como descrito para o anticorpo primário. As lâminas foram montadas utilizando *Vetashield* com DAPI (Vector Labs, Burlingame, CA), para corar núcleos celulares. A presença ou ausência da marcação fluorescente foi analisada em microscópio Nikon E800, nas objetivas de 10x, 40x e 60x, sendo as imagens capturadas utilizando o programa IPLab (Scanalytic, Vianna, VA). Foram feitas imagens seriadas com intervalos de 0,1µm, sendo estas importadas para o software Volocity para a reconstrução em 3D.

Outros cortes histológicos foram corados usando anticorpo primário anti-queratina 5 (Krt5; ThermoScientif Neomarkers), específico para células basais. Neste caso, realizou-se a recuperação antigênica utilizando microondas, onde foram feitas quatro rodadas de sequências de exposição ao calor (2 minutos), intercalada com 5 minutos de descanso, e novamente exposição ao aquecimento por mais um minuto. Em seguida, realizaram-se os procedimentos básicos de coloração, onde foi aplicado sobre os cortes histológicos o anticorpo primário anti-Krt5, na diluição 1:200 *overnight*, sendo aplicado, após as lavagens, o anticorpo secundário para Krt5 (IgG anti-coelho acoplada a CY3; Jackson Immunologicals, West Glove, PA) e contracoloração com TOPRO-3 iodide para núcleo, para observação em microscópio confocal (Zeiss Radiance 2000) e de fluorescência (Nikon E800) nas objetivas de 10x, 40x e 60x.

2.6. Proteômica

2.6.1. Coleta do material

Para análise de proteínas, os epidídimos frescos foram segmentados em cabeça, corpo e cauda e colocados em uma placa de Petri para a realização de vários cortes (*chop-chop*), em cada região, com a finalidade de extrair proteínas epididimárias. O fluido foi coletado com auxílio de ponteiras e então postos em microtubos contendo

100µL de PBS 0,01M com inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail P8340, Sigma-Aldrich®). Os microtubos foram centrifugados a 700xg por 10 minutos a 4°C (Thermo Scientific Heraeus Fresco 17 Centrifuge). Esse procedimento foi realizado duas vezes, no qual o sobrenadante era retirado e o *pellet* descartado, mas somente ao final da segunda centrifugação o sobrenadante foi congelado a -20°C para posteriormente ser processado no Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará.

2.6.2. Digestão das amostras

Quando descongeladas, as amostras foram concentradas de 100µL para 10µL utilizando o concentrador a vácuo (Concentrator plus da Eppendorf®) em temperatura ambiente por 30 minutos. Foram acrescentados 50µL de água deionizada, 10µL de bicarbonato de sódio a 50mM e as amostras foram levadas ao banho-maria à seco por 30 minutos a 80°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação foram acrescentados 2,5µL de ditioneitol (DTT;100mM) e alquilados com iodoacetamida (IAA; 300mM). As amostras foram agitadas, levadas a banho-maria seco por 30 minutos a 60°C e, posteriormente, centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos. Passado o tempo de centrifugação, foram adicionadas as amostras 400 ng de tripsina (Promega, cat. # V5111, Madison, WI, USA) e, consecutivamente, foram levadas a estufa a 37°C enroladas em papel alumínio e deixadas *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram retiradas da estufa e a digestão foi parada com 10 µL de ácido trifluoroacético (5%; Thermo Scientific, cat. # 28904, Rockford, IL, USA) por 90min (37°C). As amostras foram então centrifugadas (14000 g, 6°C, 30 min.), e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. Os extratos foram secos, ressuspensos em 10 µL de acetonitrila (5%) contendo ácido fórmico (0,1%), e transferidos para os tubos de injeção (Waters, cat. # 1860385C).

2.6.3. Identificação das proteínas

Os peptídeos oriundos da digestão com tripsina foram analisados por cromatografia capilar associada à espectrometria de massas (capillary liquid chromatography/nano electrospray ionization tandem mass spectrometry (CapLC-MS/MS)) utilizando um espectrômetro Synapt G2 HDMS (Waters Corp., Milford, MA,

USA), conectado a uma unidade de cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) nanoACQUITY (Waters Corp., USA) na Unidade de Proteômica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), conforme descrito anteriormente (Souza et al., 2012).

Os peptídeos (1-5 μL) foram injetados em solvente A (acetonitrila/água/ácido fórmico, 5/94,9/0,1) utilizando a bomba auxiliar da unidade UPLC para interagir com uma coluna Waters Symmetry 300™ (C-18, filme de 5 μm ; 0,3 mm x 5 mm) para dessalinização e pré-concentração. Após lavagem por 3 minutos com solvente A a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, os peptídeos foram então eluídos num gradiente de concentração para a coluna analítica nanoACQUITY HSS T3 (C-18 1,8 μm , 0,075 x 200 mm). A coluna analítica foi corrida em um gradiente 5 a 42% em solvente B; acetonitrila/água/ácido fórmico; 95/5/0,2; em 40 minutos. O espectrômetro foi calibrado utilizando fragmentos iônicos do peptídeo Glu-1-fibrinopeptídeo B (Glu-Fib), de forma a manter a acurácia em 10 ppm.

O espectrômetro foi operado para adquirir espectros MS/MS dos peptídeos trípticos em modo MS^E, utilizando o reconhecimento de estado de carga e limite de intensidade como critérios de seleção, através do aplicativo MassLynx 4.1. De forma a se obter os dados MS/MS, uma varredura (2 seg.) foi realizada nos dados de relação massa/carga (m/z) entre 400 e 1500. Todos os íons foram submetidos ao processo de dissociação induzida por colisão (CID), na presença de argônio.

Os espectros iônicos resultantes (6-8 seg.) foram processados utilizando o aplicativo Protein Lynx Global Server 2.5 e convertidos em arquivos de lista de picos (peak list files; PKL) para busca em bancos de dados. Para identificação das proteínas, foram feitas buscas utilizando o aplicativo ProteinLynx Global Server 4.1, contra o banco de dados da ordem Rodentia na base de dados do Swissprot. As buscas foram feitas utilizando os seguintes critérios: máximo de uma clivagem perdida da tripsina, peptídeos monoisotópicos, com modificação variável de oxidação da metionina e variação fixa de carbamidometilação das cisteínas. Os limites selecionados de tolerância para variação da massa dos peptídeos e dos fragmentos foram 0,3 e 0,1 Da, respectivamente.

2.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados descritivamente, sendo os valores da biometria e morfometria expressos como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

O peso médio dos animais foi de $22,4 \pm 1,9$ g, sendo o peso médio absoluto do epidídimo de $0,04 \pm 0,01$ g e o relativo, de $0,2 \pm 0,04$ g/100g.

3.1. Avaliação morfológica das regiões epididimárias

O epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* apresentou superfície envolta por tecido conjuntivo denso. Este conjuntivo emitiu septos para o interior do órgão, delimitando regiões que foram facilmente identificadas. Parâmetros de altura do epitélio e diâmetro tubular foram observados para a caracterização de cada região, sendo o segmento inicial a região com menor diâmetro tubular e luminal em relação às demais regiões, bem como maior altura de epitélio (Fig. 1A). As regiões da cabeça, corpo e cauda proximal variaram pouco nos parâmetros de diâmetros e altura epitelial, mas a cauda distal apresentou maiores diâmetros e menor altura de epitélio (Fig. 1B, C, D e E).

O compartimento tubular, em todas as regiões estudadas, ocupou a maior parte do parênquima epididimário que o compartimento intertubular. O compartimento tubular apresentou epitélio pseudoestratificado prismático com estereocílios e lúmen com espermatozoides. Neste epitélio foi possível observar algumas células em diversas fases de divisão mitótica, como prófase, metáfase, anáfase e telófase, independente da região (Fig. 1F). Já o compartimento intertubular, localizado entre os túbulos, mostrou-se estreito e rico em vasos sanguíneos, fibroblastos, matriz extracelular, mastócitos e macrófagos.

O segmento inicial (Fig. 1A) apresentou epitélio com células principais altas e em grande número, sendo seu núcleo predominantemente esférico, com eucromatina e um a três nucléolos evidentes, localizado na região médio-basal da célula. Foram observadas poucas células basais, localizadas na base do epitélio e apoiadas na túnica própria. Seu núcleo foi visualizado de duas formas, ora achatado ora piramidal. As células estreitas foram observadas somente neste segmento e em pouca quantidade, apresentando núcleo de formato alongado, na porção médio-apical da célula, com cromatina pouco densa quando comparada a das células principais.

A região da cabeça (Fig. 1B) apresentou diâmetro tubular e lúmen mais amplos que os observados no segmento inicial, sem alteração visível na altura epitelial. A porção supranuclear das células principais se mostraram mais claras que as da região anterior. Assim como no segmento inicial, também foram observados três tipos celulares, sendo as células principais, basais e claras. A célula clara apresentou-se em pouca quantidade e com formatos variados, podendo ser colunar estreita e semelhante ao formato de cálice. O núcleo apresentou forma esférica, vesiculoso e com nucléolos, de um a três, evidentes. Os grânulos de secreção dentro dessa célula se localizaram na porção apical, apresentando-se ora claros ora corados. Foi possível ver extrusões citoplasmáticas no lúmen, oriundas das células principais.

A região do corpo (Fig. 1C) apresentou diâmetros, tanto luminal quanto tubular, mais estreitos que os da cabeça, com a altura do epitélio sem variação perceptível. Suas células principais possuíam núcleo alongado, em sua maioria, localizado na porção médio-basal da célula. A região supranuclear, semelhante à região da cabeça, apresentou-se menos corada. As células basais apresentaram formato arredondado e pouco numerosa, quando comparada as regiões anteriores. As células claras apareceram em maior número em relação às regiões anteriores, sendo seu formato semelhante das células encontradas na cabeça, e seus grânulos apicais mais corados.

A região proximal da cauda (Fig. 1D) apresentou epitélio alto e menor diâmetro tubular que a cauda distal. Além disso, o núcleo das células principais apresentou formato alongado em sua maioria e, em alguns casos, podendo ser também esférico. Já na porção distal (Fig. 1E), as células principais apresentaram núcleo principalmente esférico. Outra diferença observada foi a espessa camada de músculo liso na região distal, não observada na cauda proximal. As células claras apresentaram-se mais numerosas na região distal que a região da cauda proximal, sendo que nas duas regiões os formatos destas células se apresentaram variadas, ora mais estreitas, podendo se assemelhar a um cálice, e ora mais larga, em formato colunar, com granulações apicais mais translúcidas que coradas.

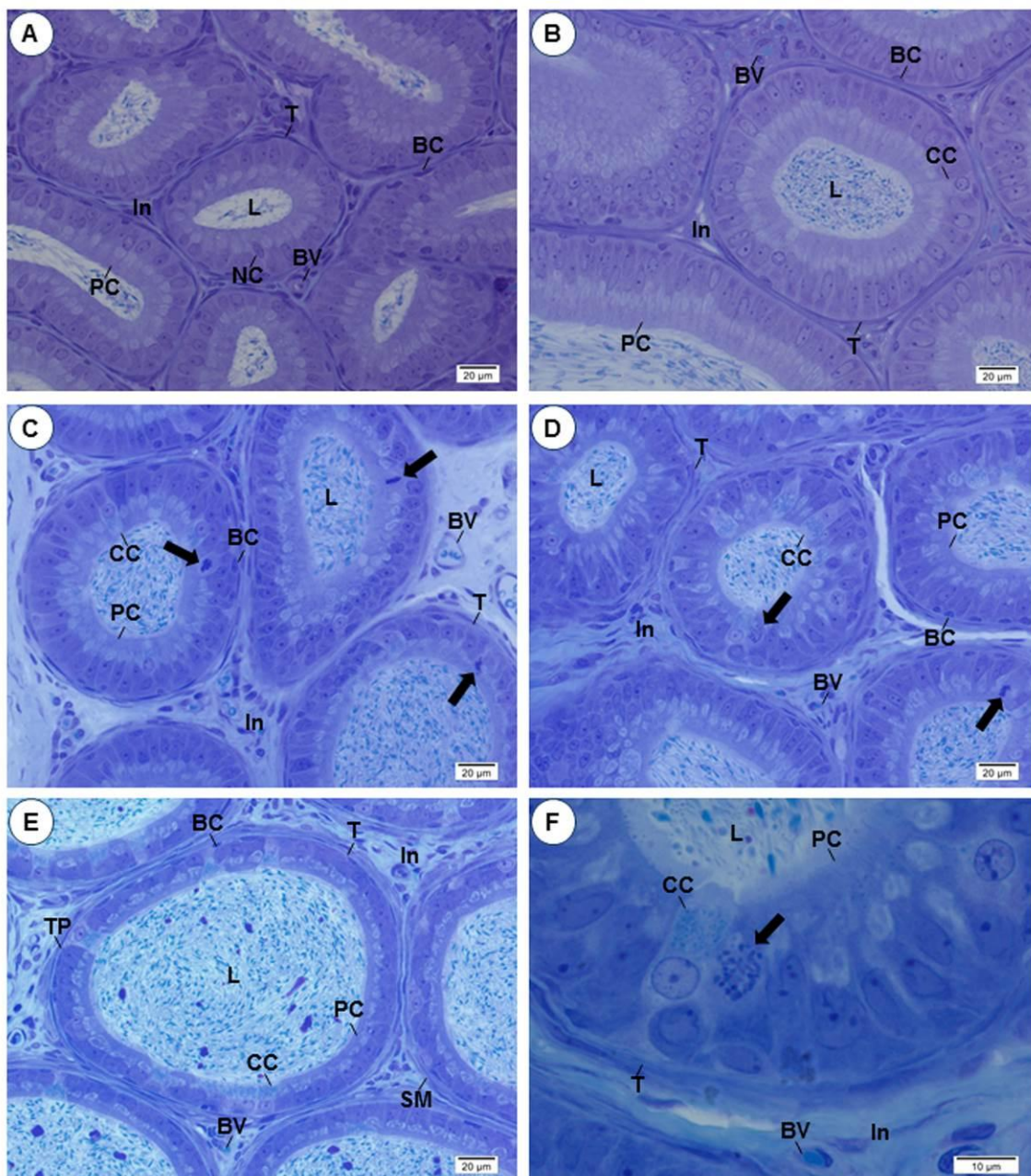


Figura 1: Fotomicrografias das regiões epididimárias de *Oligoryzomys nigripes*, mostrando o intertúbulo (In), lúmen (L), vasos sanguíneos (BV), túnica própria (T), célula principal (PC), célula basal (BC), célula estreita (NC), célula clara (CC) e músculo liso (SM). A: segmento inicial; B: cabeça; C: corpo; D: cauda proximal; E: cauda distal; F: cauda proximal. As setas apontam células em diferentes fases da divisão mitótica.

3.2. Histomorfometria epididimária

Os resultados obtidos para os parâmetros histomorfométricos avaliados estão mostrados na Tabela 1. Em *Oligoryzomys nigripes* observou-se menores diâmetros, tubular e luminal, na região do segmento inicial e maior na região da cauda distal. Houve pouca variação entre esses parâmetros para as regiões da cabeça, corpo e cauda

proximal. Já a altura média epitelial foi menor na região da cauda distal quando comparada às demais regiões, que apresentaram valores aproximados entre si.

Tabela 1 – Média e desvio-padrão dos diâmetros tubular (DT) e luminal (DL) e da altura epitelial (AE) de cinco regiões epididimárias de *Oligoryzomys nigripes*.

	DT (µm)	DL (µm)	AE (µm)
Segmento Inicial	178,7 ± 15,5	72,6 ± 5,7	53,0 ± 6,2
Cabeça	239,8 ± 23,6	132,2 ± 18,8	53,8 ± 7,2
Corpo	214,8 ± 41,4	109,9 ± 30,8	52,4 ± 6,15
Cauda Proximal	236,9 ± 22,4	135,7 ± 19,1	50,6 ± 4,7
Cauda Distal	344,3 ± 43,4	267,9 ± 44,9	38,2 ± 4,4

Os resultados obtidos para a proporção dos componentes dos compartimentos epididimários, tubular e intertubular, mostraram que o compartimento tubular representou 80,2% do total da região do segmento inicial, 82,9% da cabeça, 66,7% do corpo, 74,5% da cauda proximal e 68,3% da cauda distal. Enquanto que o principal componente tubular das regiões avaliadas foi o epitélio, na cauda distal observou-se maior percentual de lúmen com espermatozoide, seguido de epitélio e lúmen sem espermatozoide (Tab. 2). Já o compartimento intertubular ocupou 19,8% da região do segmento inicial, enquanto que na cabeça, corpo e caudas, proximal e distal, representou 17,1%, 33,3%, 25,5% e 31,7%, respectivamente. As duas primeiras regiões apresentaram maior percentual de túnica própria entre os componentes do intertúbulo, enquanto que as duas regiões da cauda e o corpo obtiveram maior percentual de tecido conjuntivo (Tab. 2).

Tabela 2: Proporção volumétrica (%) dos componentes tubulares e intertubulares das regiões do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*.

	EP	LSS	LCS	TP	TC	VS
Segmento Inicial	70,0±3,1	2,2±1,6	8,0±1,6	10,2±1,2	8,3±1,7	1,3±0,8
Cabeça	59,3±4,7	1,0±0,7	22,6±5,1	8,8±1,2	7,2±2,0	1,1±0,8
Corpo	52,0±6,5	0,3±0,3	14,4±5,3	9,7±1,7	21,6±11,0	2,0±0,8
Cauda Proximal	53,7±3,5	0,5±0,5	20,3±4,1	10,6±2,0	13,4±4,5	1,5±0,6
Cauda Distal	31,4±5,4	0,4±0,4	36,5±3,7	8,1±1,6	21,8±5,6	1,8±0,9

Média±desvio-padrão. EP: epitélio; LSS: lúmen sem espermatozoides; LCS: lúmen com espermatozoides; TP: túnica própria; TC: Tecido conjuntivo; VS: vasos sanguíneos.

O segmento inicial apresentou maior frequência de células principais (81,7%), seguido das células basais (16,8%) e das células estreitas (1,5%). Já a região da cabeça

apresentou 74,7% de células principais, 18,3% de células basais e 7% de células claras. O corpo e a cauda proximal apresentaram contagens semelhantes para as células analisadas, sendo respectivamente 68,7 e 63,9% de células principais, 22,3 e 24,9% de células basais e 9,0 e 11,2% de células claras. No percentual de células da cauda distal, 71,7% de células principais, 18,2% de células basais e 10,1% de células claras.

3.3. Imunofluorescência

A dupla coloração para AQP9 e V-ATPase B1 marcou positivamente as células principais e as células claras, respectivamente, de acordo com a distribuição destas no ducto epididimário. Todas as regiões apresentaram células principais AQP9 positivas, enquanto que a marcação da V-ATPase B1 não ocorreu no segmento inicial, devido a ausência das células claras nesse segmento.

A proteína AQP9 foi abundantemente expressa na superfície apical das células principais, como visto nas regiões da cabeça, do corpo e da cauda (Fig. 2A, B e C). A presença de longos estereocílios AQP9 positivos (em vermelho) nestas células deu a falsa impressão de marcação dessa proteína nas células clara (Fig. 2D). No entanto, observou-se que as células claras foram marcadas especificamente para a presença da enzima V-ATPase, em verde (Fig. 3 A e B).

De acordo com a marcação da proteína V-ATPase B1, observou-se aumento do número de células claras quando se analisou o epidídimo no sentido da região proximal para a distal. Essa marcação possibilitou a caracterização da distribuição das células claras no epitélio tubular, que estão intercaladas com as células principais (Fig. 2D e 3A). Além disso, observou-se variação do formato das células claras, que se mostraram largas, estreitas e caliciformes (Fig. 3A e B). A expressão da V-ATPase B1 foi vista na porção médio apical da célula, mostrando a presença de vesículas sub-apicais coradas em verde, e na superfície apical da célula, quando esta expunha as microvilosidades (Fig. 3 A e B). Foi possível observar que as células claras, quando emitem as microvilosidades, formam um estreitamento na porção apical da célula que lembra um pescoço (Fig. 3A).

Com relação às células basais, estas foram identificadas em todas as regiões do órgão a partir da expressão da proteína Krt5, marcada em vermelho, observada na dupla coloração com a V-ATPase B1 (em verde; Fig. 2F). Estas células se localizaram na porção basal do epitélio tubular, apoiadas na lâmina basal (Fig. 2E). Tanto no

microscópio de fluorescência quanto no confocal foi possível observar que esta proteína se expressava nos filamentos do citoesqueleto da célula, bem como isolados no seu interior. Foram observados prolongamentos celulares curtos e escassos se direcionando para o lúmen tubular (Fig. 2E). Em todos os animais avaliados não foram observados prolongamentos alcançando o lúmen. Apenas no microscópio confocal foi observada a presença de prolongamentos laterais abundantes e altamente ramificados, bem como a Krt5 formando uma malha tridimensional no interior da célula basal (Fig. 2F).

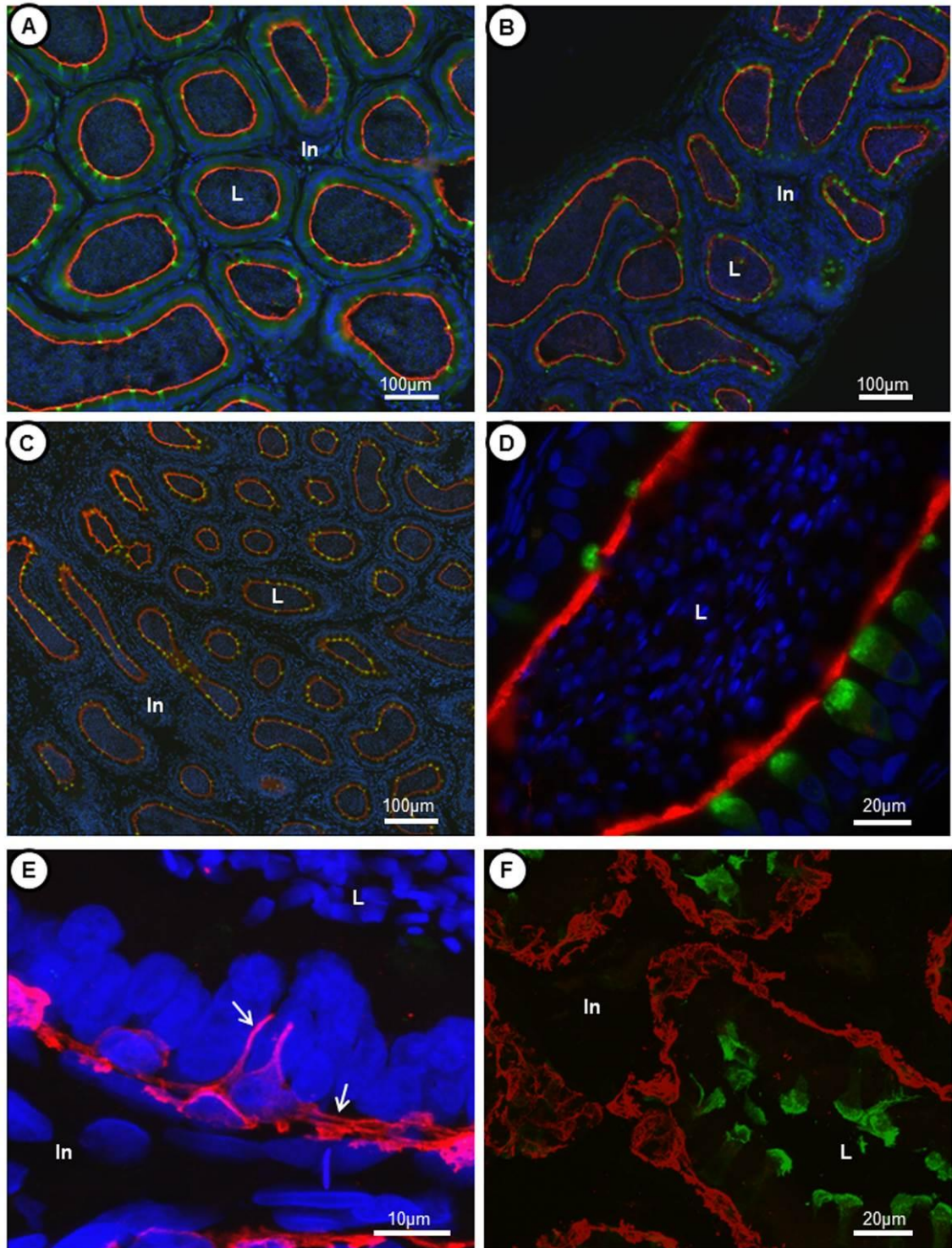


Figura 2: Imunofluorescência nas regiões do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*, mostrando marcação para AQP9 (vermelho) nas células principais e V-ATPase B1 (verde) nas células claras, nas regiões da cabeça (A), corpo (B e D) e cauda (C). Em E e F, pode-se ver a marcação para Krt5 (vermelho) nas células basais e V-ATPase B1 (verde) nas células claras. Núcleos corados com DAPI (azul) em A, B, C, D e E. As setas em E apontam os prolongamentos das células basais. L: lúmen; In: intertúbulo.

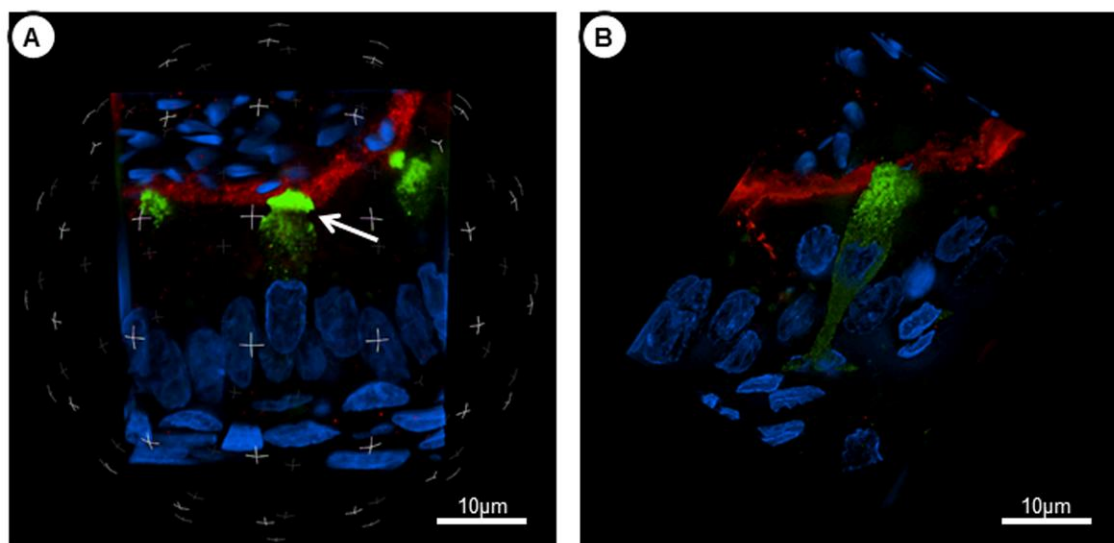


Figura 3: Reconstrução tridimensional (3D) mostrando a marcação positiva para V-ATPase B1 (verde) nas células claras e AQP9 (vermelho) nas células principais do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). A seta aponta o estreitamento na célula clara antes da emissão das suas microvilosidades. O mosaico 3D foi obtido por sobreposição de imagens de secções do epidídimo feitas com intervalo de 0,1 μ m.

3.4. Proteômica

A análise de proteínas realizada através da abordagem conhecida como “*shotgun proteomics*” identificou o total de 151 proteínas no epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* (Anexo 4).

Na região da cabeça foram identificadas 73 proteínas, sendo 37 específicas desta região (Tab. 3). As características das proteínas foram agrupadas de acordo com a ontologia gênica, conforme os papéis em processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares (Fig. 4). A maioria das proteínas relacionadas a processos biológicos estão ligadas a processos celulares (26%), de regulação (17%) e metabólicos (12%), dentre outros (Fig. 4A). Já as proteínas que atuam nas funções moleculares apresentaram, em grande parte, relações com ligação (46%) e atividade catalítica (25%), dentre outras (Fig. 4B). As proteínas agrupadas como componente celular está relacionada com citoplasma (19%), núcleo (13%) e outras organelas intracelulares (13%), dentre outros (Fig. 4C). As demais relações estão presentes na Figura 4.

Tabela 3: Proteínas específicas da região da cabeça do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* detectadas por *shotgun proteomics* (LC-ESI-MS/MS) e identificadas usando o *Protein Lynx Global Server* (v. 2.4) em comparação com registo para Rodentia do banco de dados *Swissprot*.

Região	Proteínas
Cabeça	14-3-3 protein eta chain
	14-3-3 protein gamma chain
	60 kDa heat shock protein
	Aldehyde dehydrogenase cytosolic 1
	Brain acid soluble protein 1
	Calreticulin
	CMP sialic acid transporter
	Cytochrome P450 2C70
	Cytosol aminopeptidase
	Cytosolic non-specific dipeptidase
	DBH-like monooxygenase protein 1
	DnaJ (HSP40) homolog, subfamily C, member 8
	Enolase beta
	Exostosin-2
	Glutathione S transferase
	Golgin subfamily B member 1
	Lectin-like transmembrane protein
	LRRG00114 [predicted]
	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4
	Myosin 9
	Myosin light chain kinase smooth muscle
	Nucleobindin 2
	Perilipin 3
	Peroxiredoxin 6-related sequence 1
	Pleckstrin homology-like domain family B member 1
	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3
	Protein DJ-1
	Protein Fam65b
	Protein Gm11232
	Protein Scamp3
	Protein Trex1
Retinal dehydrogenase 1	
RNA polymerase II-associated protein 3	
Serine-threonine protein kinase greatwall	
Thymosin beta 4	
Tubulin alpha 8 chain	
Ubiquitin-fold modifier 1	

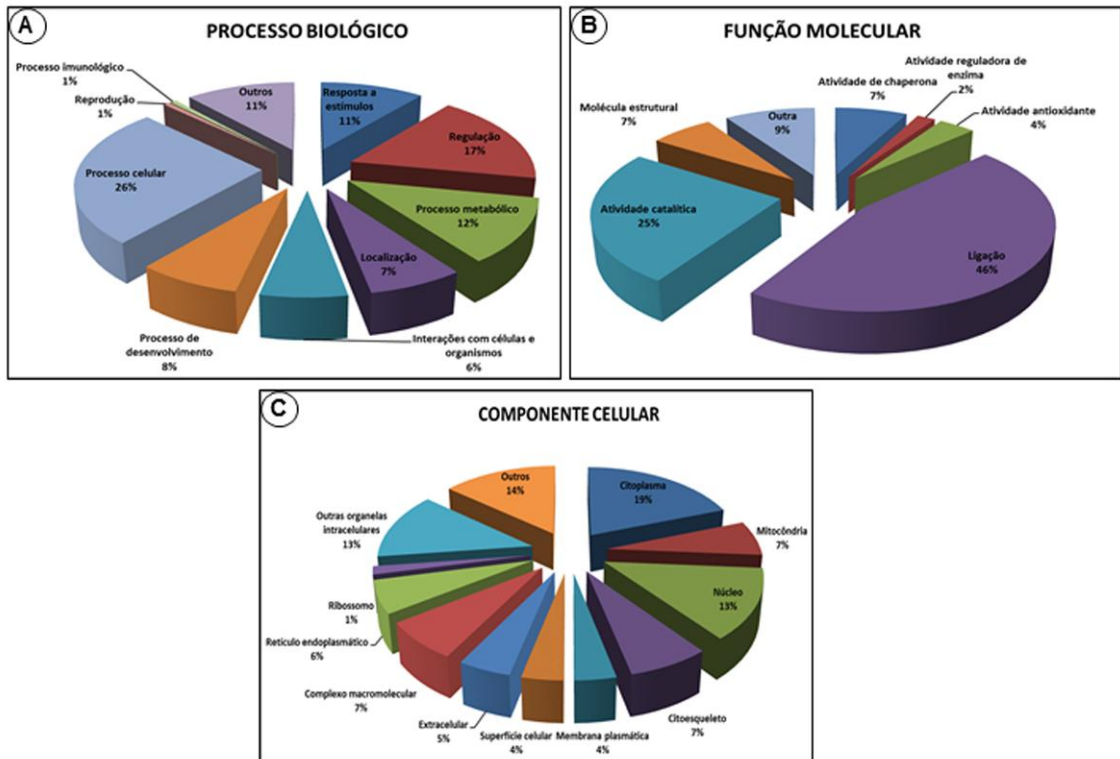


Figura 4: Gráficos mostrando anotações de ontologia gênica das proteínas identificadas na cabeça do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*, mostrando processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Os dados das proteínas foram analisados utilizando o aplicativo STRAP (*Boston University, School of Medicine*), a partir dos bancos de dados do UniProtKB e EBI GOA.

Na região do corpo foram identificadas 66 proteínas, sendo que 35 delas ocorreram apenas nesse segmento (Tab. 4). De acordo com a ontologia gênica, as proteínas responsáveis por processos biológicos apresentaram funções no processo celular (27%), regulação (20%) e respostas a estímulos (12%), dentre outros (Fig. 5A). Algumas participam de funções moleculares, podendo ser citados as ligações (47%) e atividade catalítica (23%), dentre outras (Fig. 5B). Da mesma forma, algumas auxiliam nos componentes celulares de citoplasma (20%) e núcleo (17%), dentre outros (Fig. 5C).

Tabela 4: Proteínas específicas da região da corpo do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* detectadas por *shotgun proteomics* (LC-ESI-MS/MS) e identificadas usando o *Protein Lynx Global Server* (v. 2.4) em comparação com registo para Rodentia do banco de dados *Swissprot*.

Região	Proteínas
Corpo	Aldose reductase
	Alpha actinin
	Annexin A5
	Apoptotic chromatin condensation inducer 1
	ATPase family AAA domain containing protein 2
	Chromodomain Y-like protein 2
	Coiled coil domain containing protein 112
	DNA excision repair protein ERCC 8
	DNA-binding protein RFXANK
	Endothelin converting enzyme 2
	Enolase alpha
	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3
	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 8
	G-protein coupled receptor 124
	Hepatoma-derived growth factor
	Hydroxyacid oxidase 2
	Inositol monophosphatase 3
	Integrator complex subunit 10
	Left right determination factor 2
	MHC class II antigen fragment
	Neutrophil cytosolic factor 1
	Phosphoglycerate mutase 1
	Protein Gm5533 [predicted]
	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14A
	Protein Pmp2
	Rab GDP inhibitor beta
	Ribonuclease UK114
	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase
	Serologically defined colon cancer antigen 8 homolog
	Serotransferrin
	Toll-like receptor
	Tonsoku-like protein
	Tropomyosin 2 beta
Vinculin	
WD repeat-containing protein 52	

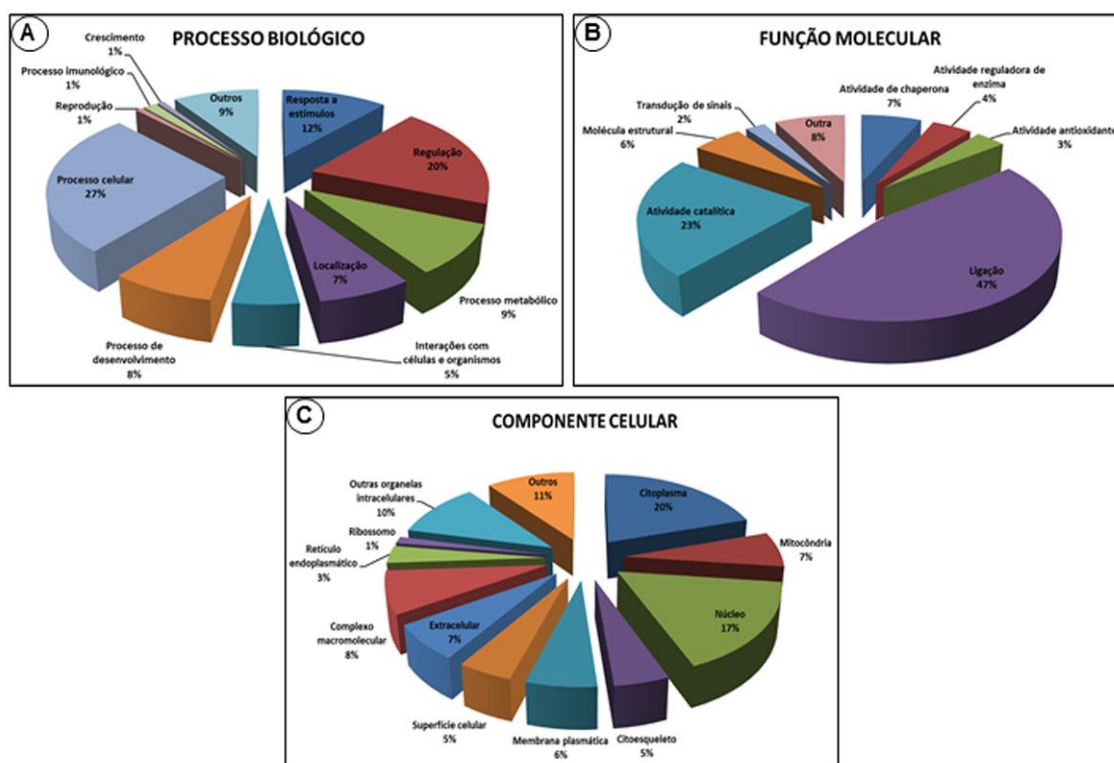


Figura 5: Gráficos mostrando anotações de ontologia gênica das proteínas identificadas no corpo do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*, mostrando processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Os dados das proteínas foram analisados utilizando o aplicativo STRAP (Boston University, School of Medicine), a partir dos bancos de dados do UniProtKB e EBI GOA.

Na cauda do epidídimo, foram identificadas 60 proteínas, com 39 das mesmas caracterizadas como desta região (Tab. 5). Nos agrupamentos funcionais da ontologia gênica relacionados a processos biológicos, as proteínas foram agrupadas em processos celulares (27%) e de regulação (23%), dentre outros (Fig. 6A). O agrupamento relacionado à função molecular apresentou a maioria das proteínas como relacionadas a processo de ligação (49%) e a atividade catalítica (17%), dentre outras (Fig. 6B). Já as proteínas que atuam como componentes celulares estavam em grande parte envolvidas com citoplasma (21%) e núcleo (16%), dentre outros (Fig. 6C).

Tabela 5: Proteínas específicas da região da cauda do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* detectadas por *shotgun proteomics* (LC-ESI-MS/MS) e identificadas usando o *Protein Lynx Global Server* (v. 2.4) em comparação com registo para Rodentia do banco de dados *Swissprot*.

Região	Proteínas
	10 kDa heat shock protein mitochondrial
	60S acidic ribosomal protein P1
	Acrosin-binding protein
	Calmodulin
	Calmodulin-like protein 3
	Calpain small subunit 1
	CD86 antigen
	Cofilin 1
	Collagen alpha 1 XVI chain
	Cooper transport protein ATOX1
	DNA-binding protein A
	Dosage compensation related protein DPY30
	FK506 binding protein12 T2
	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase testis specific
	Granulocyte macrophage colony stimulating factor receptor subunit alpha
	Hemoglobin subunit epsilon Y2
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
	Isoamyl acetate hydrolyzing esterase 1 homolog
	Magea3 protein
	MARCKS related protein
	Mast cell protease 9
	Myosin light chain 6B
	Nuclear autoantigenic sperm protein
	Peptidyl prolyl cis trans isomerase
	Programmed cell death protein 5
	Protein canopy homolog 2
	Protein CutA
	Reticulocalbin 2
	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 Yeast isoform CRA c
	snRNA activating protein complex subunit 3
	Sperm surface protein Sp17
	S-phase kinase-associated protein 1
	Stathmin
	Sulfated glycoprotein 1
	Superoxide dismutase Cu Zn
	Tubulin beta 6 chain
	Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase isozyme L1
	Whirlin
	Y box protein 2

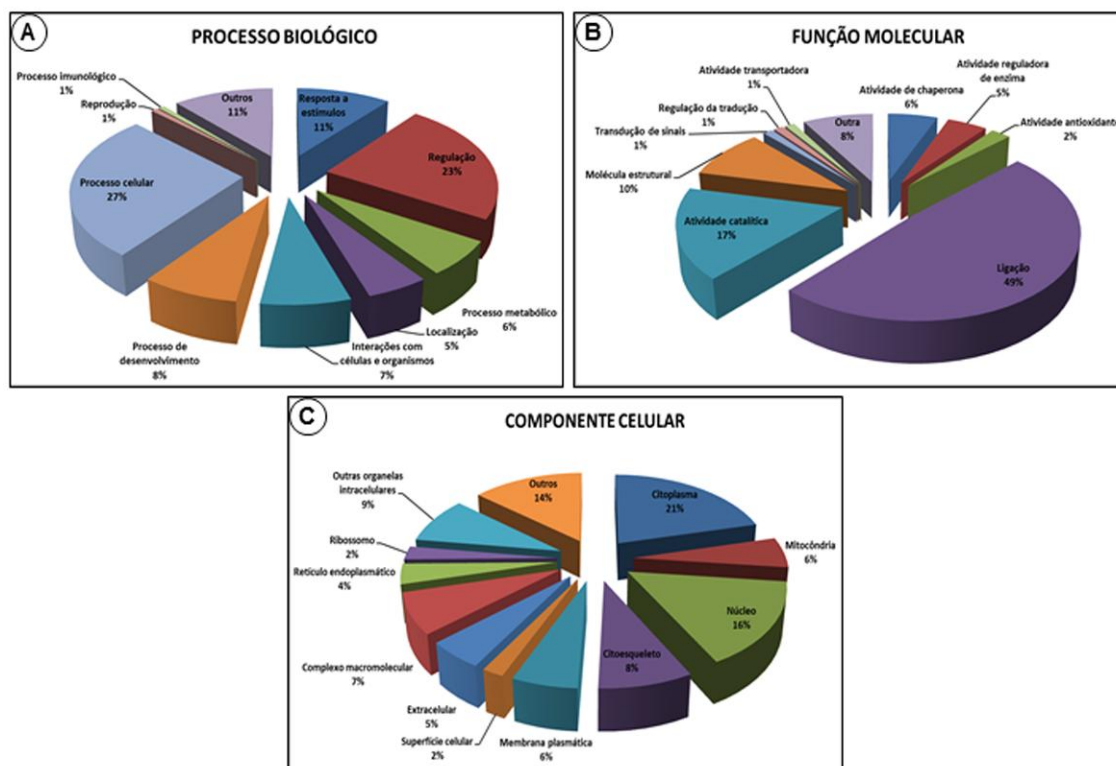


Figura 6: Gráficos mostrando anotações de ontologia gênica das proteínas identificadas na cauda do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*, mostrando processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Os dados das proteínas foram analisados utilizando o aplicativo STRAP (*Boston University, School of Medicine*), a partir dos bancos de dados do UniProtKB e EBI GOA.

Dentre as proteínas identificadas, destacam-se grupos funcionais como proteínas estruturais (por exemplo, actina e tubulina), detectadas pelo possível rompimento de células epididimárias e espermáticas durante a obtenção do fluido epididimário. Também foram identificadas proteínas que possuem ação antioxidante, como superóxido dismutase e a glutatona S-transferase, e proteases como a aminopeptidase citosólica e ribonuclease.

Algumas proteínas identificadas em *Oligoryzomys nigripes* possuem papéis bem definidos no epidídimo, contribuindo com os processos de maturação e estocagem dos espermatozoides, bem como proteção (Tab. 6).

Tabela 6: Proteínas epididimárias conhecidas identificadas no epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* detectadas por *shotgun proteomics* (LC-ESI-MS/MS) e identificadas usando o *Protein Lynx Global Server* (v. 2.4) em comparação com registo para Rodentia do banco de dados *Swissprot*.

Proteínas	Região do epidídimo		
	Cabeça	Corpo	Cauda
14-3-3 proten zeta chain	X		X
60 kDa heat shock protein	X		
Albumin	X	X	X
Aldehyde dehydrogenase cytosolic 1	X		
Aldose reductase		X	
Annexin 5		X	
Calmodulin			X
Enolase alpha		X	
Enolase beta	X		
Epididymal secretory protein E1	X	X	
Glutathione S transferase	X		
Glutathione S transferase A3	X	X	
Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase			X
Heat shock 70 kDa protein 1-like	X	X	X
Heat shock cognate 71 kDa protein	X	X	
Heat shock related 70 kDa protein 2	X	X	X
Inducible heat shock protein 70 kDa	X	X	X
Nucleobindin 2	X		
Peroxiredoxin 6	X	X	
Peroxiredoxin 6-related sequence 1	X		
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	X	X	X
Protein DJ-1	X		
Serotransferrin		X	
Superoxide dismutase Cu Zn			X

A interação de proteínas com a glutathione S-transferase A3 (Fig. 7) e a albumina (Fig. 8) foram analisadas através do programa STRING-9.05. A glutathione S-transferase A3 (Gsta3) interage com outras proteínas que atuam em conjunto na função de defesa e, até mesmo, que sinalizam na manutenção dos seus níveis favoráveis. A albumina (Alb) interage com outras proteínas que atuam em funções diversificadas, como motilidade, remodelação e inibidores de apoptose.

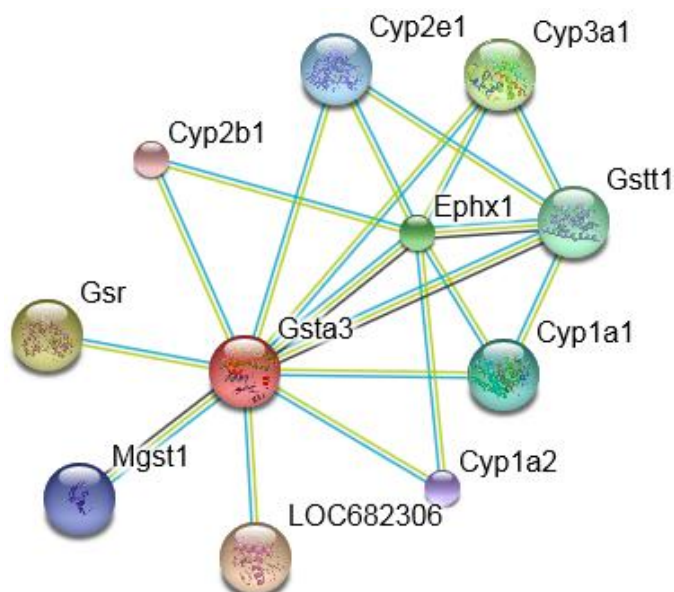


Figura 7: Rede de interação interproteica da proteína glutiona S-transferase (Gsta3) no organismo *Rattus norvegicus*, obtida com base no banco de dados STRING-9.05 mostrando as interações no modo evidência com confiabilidade de 95%. (Mgst1: Glutiona S transferase 1 microssomal; Gsr: fragmento de glutiona reductase; Cyp2b1: citocromo P450 2B1; Cyp2e1: citocromo P450 2E1; Cyp3a1: citocromo P450 3A1; Ephx1: epóxido hidrolase 1; Gsta3: glutiona S transferase tetra-1; Cyp1a1: citocromo P450 1A1; Cyp1a2: citocromo P450; LOC682306: Fosfolípido hidroperóxido de glutiona peroxidase)

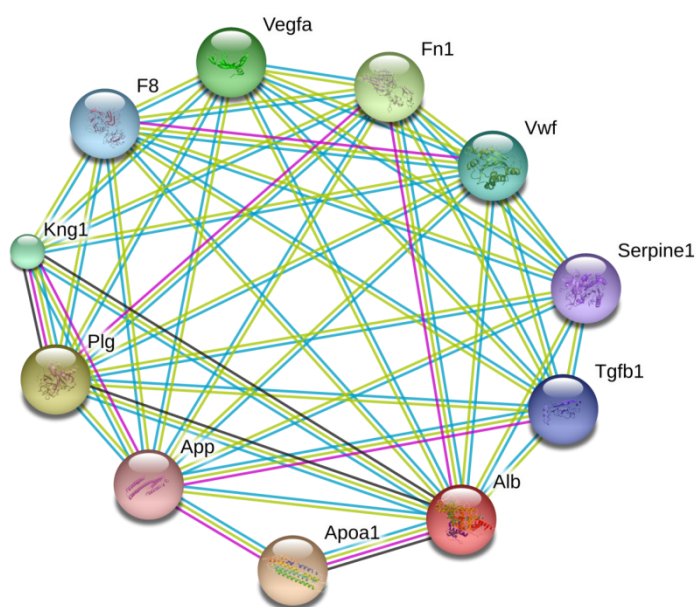


Figura 8: Rede de interação interproteica da proteína albumina (Alb) no organismo *Mus musculus*, obtida com base no banco de dados STRING-9.05 mostrando as interações no modo evidência com confiabilidade de 90%. (Apoa1: apolipoproteína A-I; App: proteína precursora beta-amilóide A4; Plg: plasminogênio; Kng1: cininogênio 1; F8: fator de coagulação VIII; Vegfa: fator de crescimento endotelial vascular A; Fn1:

fibronectina 1; Vwf: fator de von Willebrand homólogo; Serpine1: inibidor de peptidase serina (ou cisteína); Tgfb1: fator de crescimento transformador)

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação microscópica do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* mostraram que este órgão apresenta características semelhantes às descritas na literatura para a maioria das espécies de mamíferos. No entanto, foram observadas algumas diferenças relacionadas à divisão das regiões por septos conjuntivos, morfometria do diâmetro tubular e altura do epitélio ao longo do ducto epididimário, aspectos das células claras, como distribuição no epitélio tubular e formato, e células basais, como o aspecto e a quantidade dos seus prolongamentos.

Assim como descrito na literatura para ratos e camundongos (Robaire e Hinton, 2002; Turner et al., 2003; Cornwall, 2009), o epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* apresentou-se como um ducto único enovelado, altamente organizado e com regionalização claramente marcada por septos de tecido conjuntivo. Enquanto que *Oligoryzomys nigripes* apresentou cinco regiões definidas, com divisão da cauda em duas partes, foi descrito para camundongos cinco regiões, sendo a cabeça dividida em duas partes (Yeung e Cooper, 2002). Esta região, no animal aqui em análise, não apresentou septos conjuntivos dividindo-a em mais regiões. Essa regionalização epididimária e a sua área podem variar de acordo com as espécies e está relacionada com diversos fatores, como à expressão gênica, que determina o que as células irão produzir e secretar (Cornwall e Hann, 1995; Turner et al., 2003; 2007).

As médias obtidas na mensuração dos diâmetros e altura epitelial mostraram que não houve aumento gradual do diâmetro tubular com redução da altura epitelial nas regiões epididimárias, quando estas foram avaliadas da porção proximal para a distal. Em relação à altura do epitélio, assim como observado em cães (Schimming et al., 2002), a redução do epitélio ao longo do ducto foi mínima, sendo maior na região da cauda. Takano (2007), analisando a morfometria do epitélio tubular de ratos, observou que o segmento inicial apresenta maior altura do epitélio que a região da cabeça. No presente trabalho, a região proximal da cauda apresentou valores médios para diâmetros e altura epitelial parecidos com aqueles obtidos para as regiões da cabeça e do corpo. As características morfométricas da cauda distal assemelharam-se as de outras espécies, como camundongos (Takano, 2007) e ratos (Clermont e Flannery, 1970), visto que o epitélio apresentou menor altura e os diâmetros maiores que as demais regiões (Serre e

Robaire, 1998). A região do corpo apresentou mensurações semelhantes às regiões da cabeça e cauda proximal, uma característica diferente do observado em outras espécies (Lorenzana et al., 2007; Takano, 2007).

O epitélio epididimário, que aqui foi o componente com maior percentual no compartimento tubular das regiões do segmento inicial até a cauda proximal, apresentou-se com as mesmas características observadas em outras espécies, como ratos (Cornwall, 2009), camundongos (Turner et al., 2003), rato da cana (Adebayo e Olurode, 2010) e roedor mexicano (Lorenzana et al., 2007). Na microscopia de luz observou-se no epitélio pseudoestratificado células principais, estreitas, claras e basais. Não foram identificadas, na espécie analisada, células apicais e halo, que são normalmente descritas em outras espécies como sendo exclusivas da região proximal do epidídimo (Clermont e Flannery, 1970; Adamali e Hermo, 1996; Lorenzana et al., 2007). Assim como Lorenzana et al. (2007), as células estreitas em *Oligoryzomys nigripes* são menos abundantes e exclusivas da região do segmento inicial (Cornwall, 2009).

As células principais, assim como descrito por Robaire et al. (2006), foram as mais abundantes no epitélio ao longo do ducto, representando entre 60 e 80% da população total. Estas células apresentaram núcleo esférico nas porções proximais e alongados nas porções do corpo e cauda, assim como descrito por Oliva et al. (2009).

As células principais são responsáveis pela secreção e absorção de substâncias, essenciais para o controle dos constituintes do lúmen, que é realizado com auxílio das bombas, canais e transportadores de membrana presentes nas células (Serre e Robaire, 1998; Hermo e Robaire, 2002; Primiani et al., 2007). Em *Oligoryzomys nigripes*, a marcação para essa proteína foi intensa na superfície apical das células principais em todos os segmentos do epidídimo, inclusive nos estereocílios, assim como relatado em ratos por Elkjaer et al. (2000) e Pastor-Soler et al. (2002), onde é proporcionado uma via através da qual pode ocorrer o transporte transepitelial de fluido e de soluto para o lúmen (Pastor-Soler et al., 2010).

As células claras, marcadas pela proteína V-ATPase B1, possuem papel importante na manutenção do ambiente luminal ácido e apropriado para que o epidídimo exerça as funções de maturação e estocagem dos espermatozoides (Hinton e Palladino, 1995; Breton et al., 1996; Shum et al., 2009). Em *Oligozyzomys nigripes* foi feita a marcação para a isoforma B1 dessa enzima e, como já descrita em ratos, apresentou a mesma distribuição nas células claras, localizando-se na superfície apical, evidenciando as microvilosidades e vesículas ali presentes.

Além disso, a marcação com V-ATPase evidenciou características estruturais como a distribuição e o formato das células claras em *Oligoryzomys nigripes*. As células claras apresentaram-se distribuídas, na maioria das vezes, intercaladas com as células principais, diferentemente do observado em ratos e camundongos, onde estas células geralmente se colocam justapostas. O aumento no número dessas células nas regiões distais em relação às proximais pode indicar uma maior acidez na cauda do epidídimo. Shum et al. (2009) relatam a importância da função de células claras para a manutenção dos espermatozoides em seu estado quiescente. Foi possível observar que, em *Oligoryzomys nigripes*, essas células possuem diversos formatos, sendo o formato mais frequente em cálice, diferente do observado em ratos e camundongos, onde esta célula geralmente é mais larga em toda a sua extensão (Pietrement et al., 2006). Uma característica ainda não relatada em outras espécies é o estreitamento da superfície apical dessas células no momento da exposição das microvilosidades.

A marcação da proteína Krt5, específica das células basais (Gusterson et al., 2005), no epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* mostrou a presença desta tanto nos filamentos do citoesqueleto formando um arcabouço estrutural, como já observado em ratos (Shum et al., 2013), mas também em pontos isolados no citoplasma da célula. As células basais de *Oligoryzomys nigripes* apresentaram projeções citoplasmáticas curtas em direção ao lúmen, porém sem tocá-lo, como descrito por Shum et al. (2008). O alcance desses prolongamentos no lúmen fazem parte da comunicação entre as células basais e claras e a regulação do pH luminal (Leung et al., 2004; Cheung et al., 2005). Além disso, diferente do descrito na literatura (Shum et al., 2008), foi a primeira vez que observou-se projeções laterais altamente ramificadas destas células. Robaire et al. (2006) já haviam relatado que as células basais chegam a cobrir grande parte da circunferência do túbulo do epidídimo, mas grandes concentrações dessas projeções, como visualizado em *Oligoryzomys nigripes*, não havia sido relatado.

Poucos estudos relatam a presença de células em mitose no epidídimo, devido ao fato de apresentarem baixa taxa de renovação celular (Bullough, 1948). As células basais foram inicialmente estudadas como sendo as responsáveis pelo processo de renovação epitelial no epidídimo. No entanto, atualmente se sabe que esse processo de renovação é realizado por divisão das células do epitélio (Clermont e Flannery, 1970). Os epidídimos dos animais avaliados no presente trabalho apresentaram uma frequência de células principais em divisão nas regiões analisadas, caracterizando um epitélio em processo de renovação. Esse fato pode ter ocorrido devido à sazonalidade reprodutiva,

onde os órgãos reprodutores regredem periodicamente e tornam-se maiores no período reprodutivo (van Aarde e Skinner, 1986).

A secreção de proteínas pelas células epididimárias ocorrem de maneira diferenciada no ducto, variando conforme as regiões. São elas as responsáveis por promoverem modificações na membrana dos espermatozoides, realizarem sua proteção contra danos oxidativos, impedirem a sua capacitação prematura entre outras ações (Dacheux et al., 2009; Moura et al., 2010; Dacheux et al., 2012).

Para a identificação das proteínas no epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* foi utilizada a técnica denominada *shotgun* com o objetivo de obter alta detecção de peptídeos, por ser uma abordagem mais eficiente para proteínas de menor abundância (Yates, 2013). Entretanto, a ausência de algumas proteínas epididimárias na espécie estudada, como a clusterina e a prostaglandina, se deve, possivelmente, por serem de baixa abundância e, conseqüentemente, não foram detectadas pela espectrometria de massa.

Algumas proteínas identificadas possuem funções estruturais, como a anexina V encontrada no corpo do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*, que pertence a uma família de proteínas intracelulares de ligação ao Ca^{2+} e estão relacionadas com o crescimento celular, resposta inflamatória, exocitose e endocitose. No epidídimo, esta proteína é associada à atividade do músculo liso presente no intertúbulo, responsável pela contração do ducto e condução dos espermatozoides para a porção distal do órgão e para o ducto deferente (Giambanco et al., 1991). Além disso, a anexina V, também pode ser secretada para compor o fluido epididimário e se ligar aos espermatozoides que possuem danos na membrana plasmática (Glander et al., 2002). A actina é outra proteína estrutural presente no músculo liso do ducto epididimário e está envolvida na motilidade espermática, por estar presente no microtúbulo do flagelo e protege o acrossoma contra reação prematura (Moura et al., 2010).

Existem proteínas que atuam na proteção dos espermatozoides enquanto realizam o trânsito pelo epidídimo. A aldose redutase, expressada no corpo de *Oligoryzomys nigripes*, é uma proteína de superfície que ativa as vias de sinalização do estresse em resposta ao estresse oxidativo e, além disso, atua na redução de glicose em sorbitol, contribuindo para a imobilização temporária dos espermatozoides e protegendo-os contra condições hipertônicas (Kobayashi et al., 2002; Frenette et al., 2003; Sullivan et al., 2005; Belleanne et al., 2011; Dacheux et al., 2012; Staton et al., 2012). Outra proteína que atua como defesa é a DJ-1, identificada na região da cabeça

do epidídimo da espécie em estudo. Esta proteína é uma chaperona que tem papel na eliminação de espécies reativas de oxigênio, auxilia na fertilização do ovócito e no movimento do flagelo (Yoshida et al., 2003; Staton et al., 2012).

A serotransferrina, encontrada no corpo do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*, está envolvida na proteção dos espermatozoides contra quelantes de ferro livres que podem ocasionar a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, danificar a membrana dos espermatozoides. Além disso, ela participa na defesa contra microrganismos devido a sua ligação com o ferro, que é um íon essencial para o crescimento bacteriano (Moura et al., 2010; Souza et al., 2012).

A enolase foi identificada nas regiões da cabeça e do corpo epididimário de *Oligoryzomys nigripes* nas formas alfa e beta. Esta proteína é uma enzima glicolítica que pode atuar nas porções de açúcar encontradas em glicoproteínas na membrana do espermatozoide, auxiliando no seu processo de maturação, além de indicar estresse metabólico e participar de reações alérgicas (Gitlits et al., 2000; Moura et al., 2010; Staton et al., 2012).

Outras proteínas que atuam na proteção de espermatozoides contra a peroxidação também foram identificadas em *Oligoryzomys nigripes*, dentre as quais albumina, presente nas três regiões epididimárias, superóxido dismutase cobre-zinco (Cu Zn), presente somente na cauda, glutathione S-transferase e peroxirredoxina 6, ambas expressadas nas regiões da cabeça e corpo. Estas proteínas atuam na superfície da membrana do espermatozoide como antioxidantes e os protegem dos danos oxidativos, contribuindo para a sua sobrevivência durante o trânsito e o armazenamento no epidídimo (Holland et al., 1982; Dacheux et al., 2006; Moura et al., 2010; Belleanne et al., 2011; Dacheux et al., 2012; Staton et al., 2012; Upadhyay et al., 2013).

Com base nas análises das redes de interação, observou-se que a enzima glutathione S-transferase interage com outras isoformas de glutathione e com diferentes isoformas do citocromo P450. Essa rede formada mostra como funciona a ligação entre as proteínas de defesa, atuando de maneira ordenada a fim de proteger os espermatozoides contra danos e, conseqüentemente, garantir a fertilidade. A rede de interação da albumina mostrou-se mais ampla, no qual existem correlações com diversas proteínas que atuam de diferentes formas no epidídimo, podendo participar da proteção contra radicais livres, da motilidade e da capacitação espermática (Go e Wolf, 1985; Moura et al., 2010; Souza et al., 2012).

No epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* foram identificados 5 tipos de proteínas de choque térmico (HSP), sendo a HSP1 70kDa, HSP2 70kDa e a HSP 70kDa indizível observadas nas três regiões, enquanto que a HSP 71kDa cognata foi localizada nas regiões da cabeça e da cauda e a HSP 60kDa identificada apenas na cabeça. As proteínas de choque térmico são integrantes de uma família de proteínas homólogas que podem atuar como chaperonas, ajudando no enovelamento e direcionamento de outras proteínas, ou em situações de estresse físico e também químico (Chai et al., 1999; Son et al., 1999). A HSP 1 atua em resposta ao dano celular e protegendo as células, evitando o acúmulo de proteínas deformadas e bloqueando vias de apoptose (Souza et al., 2012). A HSP 2 está relacionada com a proteção dos espermatozoides contra reação imunológica, evitando que sejam reconhecidos e destruídos durante o trânsito pelo epidídimo (Akama et al., 2010; Belleannee et al., 2011). A HSP 60kDa está ligada a maturidade espermática, no que se diz respeito a capacitação e motilidade (Asquith et al., 2005; Lachance et al., 2010). A ubiquitina é outra chaperona identificada no epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*. Ela está associada com a eliminação dos espermatozoides defeituosos, auxilia na remodelação da cabeça do espermatozoide e na proteção da ação do sistema imunológico (Kwon et al., 2005; Sullivan et al., 2005; Baska et al., 2007).

Determinadas proteínas possuem papéis diretamente relacionados com a maturação espermática e foram identificadas no epidídimo da espécie em estudo. A proteína de ligação a fosfatidiletanolamina foi detectada em todas as regiões do epidídimo e acredita-se que ela possui função de reorganizar a membrana do espermatozoide durante a maturação. É apontada como responsável pela manutenção dos antígenos na superfície do espermatozoide (Frayne et al., 1998). Outra proteína que atua na remodelação da membrana do espermatozoide é a proteína secretora epididimária E1 (Moura et al., 2010; Souza et al., 2012), que foi identificada no presente estudo na cabeça e no corpo do epidídimo. O gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, identificado na região da cauda, auxilia na motilidade e na capacitação espermática (Liu et al., 2013). A calmodulina, expressada na região da cauda, está envolvida na sinalização celular mediada por cálcio e é capaz de regular a motilidade espermática, bem como atuar na capacitação e na reação acrossômica (Moura et al., 2010). A nucleobindina é outra proteína que se liga ao cálcio, identificada na cabeça do epidídimo desses roedores, responsável pelas vias de sinalização em que esse íon está presente e na interação entre células (Wendel et al., 1995; Moura et al., 2007; 2010).

As proteínas da família 14-3-3 foram identificadas em todas as regiões do epidídimo de *Oligoryzomys nigripes*, com maior frequência na cabeça e cauda do epidídimo. Esta proteína participa de diversas interações proteicas e processos como, apoptose, tráfego de proteínas e resposta ao estresse (Dougherty e Morrison, 2004; Staton et al., 2012). Além disso, a 14-3-3 pode auxiliar na remodelação de uma proteína alvo e, conseqüentemente, alterar suas propriedades, bem como atuar na regulação da motilidade espermática (Sun et al., 2009; Souza et al., 2012).

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir com esse trabalho que:

- A morfologia epididimária de *Oligoryzomys nigripes* assemelha-se com a de ratos e camundongos, porém existem diferenças como ausência de células halo e apicais;
- Morfometricamente, o epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* também apresentou distinção com o descrito na literatura para outras espécies dessa ordem, uma vez que o diâmetro do ducto e a altura do epitélio mostraram-se semelhantes em todos os segmentos, não existindo aumento gradual, exceto na cauda distal que se apresentou conforme o já descrito;
- Nesses roedores, a visualização de células epididimárias em divisão mitótica foi mais comum do que o descrito para ratos e camundongos;
- As células principais apresentaram marcação positiva para aquaporina 9 na superfície apical, ao longo de todo o ducto epididimário;
- A marcação com V-ATPase B1 permitiu a observação do formato variado das células claras, de estreitas a caliciformes. Além da sua distribuição, na maioria das vezes, ser intercalada entre as células principais;
- Foram observados poucos prolongamentos nas células basais em direção ao lúmen epididimário, através da marcação da proteína queratina 5, porém foram visualizados muitos prolongamentos laterais, curtos e altamente ramificados;
- Foram observadas marcações da queratina 5 também no interior das células basais, além da presença na membrana plasmática;
- Por fim, as proteínas presentes no epidídimo de *Oligoryzomys nigripes* são encontradas em outras espécies animais e, sua maioria, possuem estudos sobre

sua função no epidídimo e, até mesmo, sua ação nos processos de maturação, capacitação e estocagem espermática.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo descritivo do epidídimo de espécies silvestres é extremamente importante, visto que esses animais estão em um ambiente que vem sofrendo constantes alterações. Algumas dessas mudanças ocasionam prejuízos no processo reprodutivo e até mesmo perturbações fisiológicas, que tem a capacidade de desencadear casos de infertilidade.

Além disso, os estudos exploratórios dos padrões reprodutivos das espécies silvestres podem servir de início para entendermos possíveis alterações causadas por ação de poluentes ambientais e desvendar os níveis de poluição nessas áreas, podendo servir de base para ações conservacionistas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMALI, HI; HERMO, L. 1996. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *Journal of Andrology*, vol. 17, nº. 3.

ADEBAYO, AO; OLURODE, SA. 2010. The morphology and morphometry of the epididymis in the greater cane rat (*Thryonomys swinderianus* Temmincks). *Folia Morphol.*, vol. 69, nº. 4, pp. 246-252.

AGRE, P; BROWN, D; NIELSEN, S. 1995. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr. Opin. Cell Biol.*, Aug; 7(4): 472-83.

AKAMA, K; HORIKOSHI, T; SUGIYAMA, A; NAKAHATA, S; AKITSU, A; NIWA, N; INTOH, A; KAKUI, Y; SUGAYA, M; TAKEI, K; IMAIZUMI, N; SATO, T; MATSUMOTO, R; IWAHASHI, H; KASHIWABARA, S; BABA, T; NAKAMURA, M; TODA, T. 2010. Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, Jun.; 1804(6): 1272-84.

AMANN, RP. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *Am. J. Anat.*, Jan; 110: 49-67.

ASQUITH, KL; HARMAN, AJ; MCLAUGHLIN, EA; NIXON, B; AITKEN, RJ. 2005. Localization and significance of molecular chaperones, heat shock protein 1, and tumor rejection antigen gp96 in the male reproductive tract and during capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, Feb; 72(2): 328-37.

BASKA, KM; MANANDHAR, G; FENG, D; AGCA, Y; TENGOWSKI, MW; SUTOVSKY, M; YI, YJ; SUTOVSKY, P. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J Cell Physiol.*, Jun; 215(3): 684-96.

BELLEANNÉE, C; BELGHAZI, M; LABAS, V; TEIXEIRA-GOMES, AP; GATTI, JL; DACHEUX, JL; DACHEUX, F. 2011. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*, May; 11(10): 1952-64.

BRETON, S; SMITH, PJ; LUI, B; BROWN, D. 1996. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med.*, Apr; 2(4): 470-2.

BULLOUGH, WS. 1948. Mitotic activity in the adult male mouse, *Mus musculus* L. the diurnal cycles and their relation to waking and sleeping. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 135.

CÁCERES, NC. 2002. Food habits and seed dispersal by the White-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in Southern Brazil. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.*, 37: 97-104.

CÁCERES, NC; CARMIGNOTTO, AP; FISCHER, E; SANTOS, CF. 2008. Mammals from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List* 4(3): 321–335.

CÁCERES, NC; DITTRICH, VAO; MONTEIRO-FILHO, ELA. 1999. Fruit consumption, distance of seed dispersal and germination of Solanaceous plants ingested by common opossum (*Didelphis aurita*) in Southern Brazil. *Rev. Ecol.*, 54: 225-233.

CAMPANILI, M; PROCHNOW, M. 2006. Mata Atlântica: Uma rede pela floresta. RMA (Rede de ONGs da Mata Atlântica), 332p.: il.; 30cm.

CANALE, GR; PERES, CA; GUIDORIZZI, CE; GATTO, CAF; KIERULFF, MCM. 2012. Pervasive defaunation of forest remnants in a tropical biodiversity hotspot. *Plos One*, August, vol. 7, issue 8.

CARVALHO, FM; PINHEIRO, PS; FERNANDEZ, FAS; NESSIMIAN, JL. 1999. Diet of small mammals in Atlantic Forest fragments in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Zoo. Juiz de Fora*, 1: 91-101.

CHAI, Y; KOPPENHAFFER, SL; BONINI, NM; PAULSON, HL. 1999. Analysis of the role of heat shock protein (HSP) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci.*, Dec 1; 19(23): 10338-47.

CHEUNG, KH; LEUNG, GP; LEUNG, MC; SHUM, WW; ZHOU, WL; WONG, PY. 2005. Cell–cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *J Gen Physiol.*, May; 125(5): 443-54.

CLERMONT, Y; FLANNERY, J. 1970. Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. *Biology of Reproduction* 3, 283-292.

COLOMBO, AF; JOLY, CA. 2010. Brazilian Atlantic Forest *lato sensu*: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Braz. J. Biol.*, vol. 70, n° 3 (suppl.), p. 697-708.

CORNWALL, GA. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, vol.15, n° 2, pp. 213–227.

CORNWALL, GA; HANN, SR. 1995. Specialized gene expression in the epididymis. *Journal of Andrology*, vol. 16, n° 5.

COSENTINO, MJ; COCKETT, ATK. 1986. Review article: structure and function of the epididymis. *Urological Research*, 14: 229-240.

COX, MP; DICKMAN, CR; HUNTER, J. 2003. Effects of rainforest fragmentation on non-flying mammals of the Eastern Dorrigo Plateau, Australia. *Biol. Conserv.*, 115: 175-189.

DACHEUX, JL; BELGHAZI, M; LANSON, Y; DACHEUX, F. 2006. Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol.*, May 16; 250(1-2): 36-42.

DACHEUX, JL; BELLEANNÉE, C; GUYONNET, B; LABAS, V; TEIXEIRA-GOMES, AP; ECROYD, H; DRUART, X; GATTI, JL; DACHEUX, F. 2012. The

contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med.*, Aug; 58(4): 197-210.

DACHEUX, JL; BELLEANNÉE, C; JONES, R; LABAS, V; BELGHAZI, M; GUYONNET, B; DRUART, X; GATTI, JL; DACHEUX, F. 2009. Mammalian Epididymal Proteome. *Mol Cell Endocrinol.*, Jul 10; 306(1-2): 45-50.

DACHEUX, JL; CASTELLA, S; GATTI, JL; DACHEUX, F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, Jan.15; 63 (2): 319-41.

DOUGHERTY, MK; MORRISON, DK. 2004. Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci.*, Apr 15; 117(Pt 10): 1875-84.

ELKJAER, M; VAJDA, Z; NEJSUM, LN; KWON, T; JENSEN, UB; AMIRY-MOGHADDAM, M; FRØKIAER, J; NIELSEN, S. 2000. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem Biophys Res Commun.*, Oct 5; 276(3): 1118-28.

FOUCHÉCOURT, S; MÉTAYER, S; LOCATELLI, A; DACHEUX, F; DACHEUX, JL. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod.*, Jun; 62(6): 1790-803.

FRAYNE, J; MCMILLEN, A; LOVE, S; HALL, L. 1998. Expression of phosphatidylethanolamine-binding protein in the male reproductive tract: immunolocalisation and expression in prepubertal and adult rat testes and epididymides. *Mol Reprod Dev.*, Apr; 49(4): 454-60.

FRENETTE, G; LESSARD, C; MADORE, E; FORTIER, MA; SULLIVAN, R. 2003. Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biol Reprod.*, Nov; 69(5): 1586-92.

GIAMBANCO, I; PULA, G; CECCARELLI, P; BIANCHI, R; DONATO, R. 1991. Immunohistochemical localization of annexin V (CaBP33) in rat organs. *J Histochem Cytochem.*, Sep;39(9):1189-98.

GITLITS, VM; TOH, BH; LOVELAND, KL; SENTRY, JW. 2000. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. *Eur J Cell Biol.*, Feb; 79(2): 104-11.

GLANDER, HJ; SCHILLER, J; SÜSS, R; PAASCH, U; GRUNEWALD, S; ARNHOLD, J. 2002. Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lyso-phosphatidylcholines. *Andrologia*, Dec; 34(6):360-6.

GO, KJ; WOLF, DP. 1985. Albumin-Mediated Changes in Sperm Sterol Content During Capacitation. *Biol Reprod.*, Feb; 32(1): 145-53.

GUSTERSON, BA; ROSS, DT; HEATH, VJ; STEIN, T. 2005. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, May 5; 7(4): 143-8.

HERMO, L; ROBAIRE, B. 2002. Epididymal cell types and their functions. In Robaire, B; Hinton; BT. eds. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 81–102.

HINTON, BT; PALLADINO, MA. 1995. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech.*, Jan 1; 30(1): 67-81.

HOLLAND, MK; ALVAREZ, JG; STOREY, BT. 1982. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.*, Dec; 27(5): 1109-18.

KARNOVSKY, MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, April 15; 27: 137-8A

KOBAYASHI, T; KANEKO, T; IUCHI, Y; MATSUKI, S; TAKAHASHI, M; SASAGAWA, I; NAKADA, T; FUJII, J. 2002. Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. *J Androl.*, Sep-Oct; 23(5): 674-83.

KWON, J; MOCHIDA, K; WANG, YL; SEKIGUCHI, S; SANKAI, T; AOKI, S; OGURA, A; YOSHIKAWA, Y; WADA, K. 2005. Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol Reprod.*, Jul; 73(1): 29-35.

LACHANCE, C; FORTIER, M; THIMON, V; SULLIVAN, R; BAILEY, JL; LECLERC, P. 2010. Localization of Hsp60 and Grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa. *Int J Androl.*, Feb; 33(1): 33-44.

LAURANCE, WF; BIERREGAARD, RO. 1997. Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities. The University of Chicago Press, Chicago and London.

LEITE, YLR; STALLINGS, JR; COSTA, LP. 1994. Partição de recursos entre espécies simpátricas de marsupiais na Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Biol.*, 54: 525-536.

LEUNG, GP; CHEUNG, KH; LEUNG, CT; TSANG, MW; WONG, PY. 2004. Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol.*, Mar 15; 216(1-2): 5-13.

LIU, J; SUN, CM; ZHANG, CL; WANG, X; LI, JY. 2013. Location and Characterization of GAPDS in Male Reproduction. *Urol Int.*, 90(4): 449-54.

LORENZANA, MG; LÓPEZ-WILCHIS, R; GÓMEZ, CS; ARANZABAL, CU. 2007. A light and scanning electron microscopic study of the epididymis active state of the

endemic mexican rodent *Peromyscus winkelmani* (Carleton) (Rodentia: Muridae). Anat. Histol. Embryol. 36, 230-240.

MMA- Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. 2000. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Conservation International do Brasil, Fundação SOS Mata Atlântica e Fundação Biodiversitas, Brasília.

MOURA, AA; CHAPMAN, DA; KILLIAN, GJ. 2007. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. Mol Reprod Dev., Feb; 74(2): 214-22.

MOURA, AA; SOUZA, CE; STANLEY, BA; CHAPMAN, DA; KILLIAN, GJ. 2010. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. J Proteomics., Sep 10; 73(10): 2006-20.

OLIVA, SU; RINALDO, PA; STUMPP, T. 2009. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. O mundo da Saúde, v. 33, nº.4, p 419-425.

PASTOR-SOLER, N; BAGNIS, C; SABOLIC, I; TYSZKOWSKI, R; MCKEE, M; VAN HOEK, A; BRETON, S; BROWN, D. 2001. Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. Biol Reprod., Aug; 65(2): 384-93.

PASTOR-SOLER, NM; FISHER, JS; SHARPE, R; HILL, E; VAN HOEK, A; BROWN, D; BRETON, S. 2010. Aquaporin 9 expression in the developing rat epididymis is modulated by steroid hormones. Reproduction., Mar; 139(3): 613-21.

PASTOR-SOLER, N; ISNARD-BAGNIS, C; HERAK-KRAMBERGER, C; SABOLIC, I; VAN HOEK, A; BROWN, D; BRETON, S. 2002. Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. Biol Reprod., Jun; 66(6): 1716-22.

PIETREMENT, C; SUN-WADA, G-H; DA SILVA, N; MCKEE, M; MARSHANSKY, V; BROWN, D; FUTAI, M; BRETON, S. 2006. Distinct expression patterns of

different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biology of Reproduction*, 74: 185-194.

PRIMACK, RB; RODRIGUES, E. 2001. *Biologia da Conservação*. Ed: Planta.

PRIMIANI, N; GREGORY, M; DUFRESNE, J; SMITH, CE; LIU, YL; BARTLES, JR; CYR, DG; HERMO, L. 2007. Microvillar size and espin expression in principal cells of the adult rat epididymis are regulated by androgens. *J Androl.*, Sep-Oct; 28(5): 659-69.

RAMBALDI, DM. In: RAMBALDI, DM; OLIVEIRA, DAS. 2003. *Fragmentação de ecossistemas - causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas*. Brasília: MMA/SBF.

REIG, AO. 1984. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores Muroídeos sulamericanos (Cricetidae: Signodontinae). *Rev. Bras. Genet.* VII, 2, 333-365.

REIS, NR; PERACCHI, AL; PEDRO, WA; LIMA, IP. 2006. *Mamíferos do Brasil*. Londrina. 437 p.: il.

RIBEIRO, MC; METZGER, JP; MARTENSEN, AC; PONZONI, FJ; HIROTA, MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142: 1141–1153.

ROBAIRE, B; HINTON, BT. 2002. *The Epididymis: from molecules to clinical practice: a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis, and the vas deferens*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

ROBAIRE, R; HINTON, BT; ORGEBIN-CRIST, M-C. 2006. The epididymis. In: *Knobil. Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Cambridge: Elsevier, P.1071-1148.

ROBAIRE, R; SEENUNDUN, S; HAMZEH, M; LAMOUR, S-A. 2007. Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian J. Androl*; 9 (4): 545-533.

SCHIMMING, BC; VICENTINI, CA; TIRAPELLI, LF; TIRAPELLI, DPC. 2002. Observações morfológicas no ducto epididimário do cão. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 39, nº. 2, p. 61-65.

SENGER, PL. 2003. *Pathways to pregnancy and parturition*. Washington: Second Edition, Current Conception.

SERRE, V; ROBAIRE, B. 1998. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biology of Reproduction* 58, 497-513.

SHUM, WWC; HILL, E; BROWN, D; BRETON, S. 2013. Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. *Reproduction.*, Oct 1;146(5): 455-469.

SHUM, WWC; DA SILVA, N; BROWN, D; BRETON, S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of Experimental Biology*, 212: 1753-1761.

SHUM, WW; DA SILVA, N; MCKEE, M; SMITH, PJ; BROWN, D; BRETON, S. 2008. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*, Dec 12; 135(6): 1108-17.

SON, WY; HWANG, SH; HAN, CT; LEE, JH; KIM, S; KIM, YC. 1999. Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Mol Hum Reprod.*, Dec; 5(12): 1122-6.

SOUZA, CE; REGO, JP; LOBO, CH; OLIVEIRA, JT; NOGUEIRA, FC; DOMONT, GB; FIORAMONTE, M; GOZZO, FC; MORENO, FB; MONTEIRO-MOREIRA, AC; FIGUEIREDO, JR; MOURA, AA. 2012. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *J Proteomics.*, Jul 19; 75(14): 4436-56.

STANTON, PG; SLUKA, P; FOO, CF; STEPHENS, AN; SMITH, AI; MCLACHLAN, RI; O'DONNELL, L. 2012. Proteomic changes in rat spermatogenesis in response to in vivo androgen manipulation; impact on meiotic cells. *PLoS One.*, 7(7): e41718.

SULLIVAN, R; SAEZ, F; GIROUARD, J; FRENETTE, G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis.*, Jul-Aug;35(1):1-10.

SUN, S; WONG, EW; LI, MW; LEE, WM; CHENG, CY. 2009. 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein–protein interactions during spermatogenesis. *J Endocrinol.*, Sep;202(3):327-36.

TAKANO, H. 2007. Histological division of mouse epididymis based on regional differences. *Hirosaki Med. J.* 59 (suppl.): S292-S301.

TURNER, TT; BOMGARDNER, D; JACOBS, JP; NGUYEN, QAT. 2003. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125, 871-878.

TURNER, TT; JOHNSTON, DS; JELINSKY, SA; TOMSIG, JL; FINGER, JN. 2007. Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. *Asian Journal of Andrology*, 9(4): 565-573.

UPADHYAY, RD; BALASINOR, NH; KUMAR, AV; SACHDEVA, G; PARTE, P; DUMASIA, K. 2013. Proteomics in reproductive biology: beacon for unraveling the molecular complexities. *Biochim Biophys Acta.*, Jan; 1834(1): 8-15.

VAN AARDE, RJ; SKINNER, JD. 1986. Reproductive biology of the male Cape porcupine, *Hystrix africae australis*. *J Reprod Fertil.*, Mar; 76 (2): 545-52.

VIEIRA, MV. 1997. Dynamics of a rodent assemblage in a Cerrado of southeast Brazil. *Rev. Brasil. Biol.*, 57: 99-107.

WENDEL, M; SOMMARIN, Y; BERGMAN, T; HEINEGÅRD, D. 1995. Isolation, characterization, and primary structure of a calcium-binding 63-kDa bone protein. *J Biol Chem.*, Mar 17; 270 (11): 6125-33.

YATES, JR. 2013. The Revolution and Evolution of Shotgun Proteomics for Large-Scale Proteome Analysis. *J Am Chem Soc.*, Feb 6;135(5): 1629-40.

YEUNG, C; COOPER, TG. 2002. Acquisition and development of sperm motility upon maturation in the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT (eds). *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 417–434.

YOSHIDA, K; SATO, Y; YOSHIKE, M; NOZAWA, S; ARIGA, H; IWAMOTO, T. 2003. Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue. *Mol Reprod Dev.*, Dec; 66(4): 391-7.

ANEXO 1: Preparo da solução Karnovsky

SOLUÇÃO A - Paraformaldeído 4%

100mL de paraformaldeído 40%

900mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,3 (450mL de água destilada + 450mL de tampão fosfato 0,2M)

SOLUÇÃO B - Glutaraldeído

160mL de glutaraldeído 25%

420mL de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,3

420mL de água destilada

As soluções são misturadas na hora do uso na proporção 1:1

ANEXO 2: Preparo do fixador paraformaldeído-lisina-periodato (PLP)

Preparo da solução:

1,425mL de fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) a 0,2M

6,1mL de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) a 0,2M

22,48mL de água destilada

0,0855g de periodato de sódio

0,548g de lisina

2g de sacarose

1 ampola de 10mL de paraformaldeído a 16%

Misturar os reagentes.

ANEXO 3: Azul de toluidina-borato de sódio 1%

0,5g de Azul de toluidina

1,0g de borato de sódio

99mL de água destilada

Dissolver o borato de sódio na água destilada e em seguida adicionar o azul de toluidina, agitar e filtrar.

ANEXO 4: Proteins detected by shotgun proteomics (LC-ESI-MS/MS) in different regions of the epididymis of *Oligoryzomys nigripes* of Minas Gerais state. Protein searches were run using the Protein Lynx Global Server (v. 2.4) against Rodentia entries of the Swissprot database.

Protein	Protein accession	Protein entry	Protein score	Protein average mass (Da)	Isoelectric point (pI)	Epididymis		
						Caput	Corpus	Cauda
10 kDa heat shock protein mitochondrial	P26772	CH10_RAT	1035.1300	10901.6823	8.89			x
14-3-3 protein beta chain	P35213	1433B_RAT	464.2900	28054.4568	4.81	x	x	
14-3-3 protein epsilon chain	P62259	1433E_MOUSE	184.6087	29173.9848	4.63	x		x
14-3-3 protein eta chain	P68510	1433F_MOUSE	122.2353	28211.8073	4.81	x		
14-3-3 protein gamma chain	P61982	1433G_MOUSE	150.1078	28302.6606	4.80	x		
14-3-3 protein theta chain	P68254	1433T_MOUSE	215.3684	27778.3525	4.69	x		x
14-3-3 protein zeta chain	P63101	1433Z_MOUSE	762.6537	27771.2128	4.73	x		x
60 kDa heat shock protein	P63038	CH60_MOUSE	127.6228	60955.6372	5.91	x		
60S acidic ribosomal protein P1	P19944	RLA1_RAT	422.9958	11497.9649	4.23			x
78 kDa glucose-regulated protein	P20029	GRP78_MOUSE	143.1719	72422.1642	5.07	x	x	x
Acrosin-binding protein	Q3V140	ACRBP_MOUSE	189.1965	61140.9422	4.95			x
Actin beta	P60710	ACTB_MOUSE	1661.6980	41736.8880	5.29	x	x	x
Actin gamma 1	P63260	ACTG_MOUSE	1620.4680	41792.9956	5.31	x	x	x
Acyl-CoA-binding protein	P31786	ACBP_MOUSE	1388.8680	15228.5722	9.56	x	x	
AHNAK protein	Q6UL10	Q6UL10_MOUSE	82.9145	224131.1645	6.06	x		x
Albumin	P07724	ALBU_MOUSE	814.1527	68692.7974	5.75	x	x	x

Aldehyde dehydrogenase cytosolic 1	P13601	AL1A7_RAT	81.5053	43893.2706	5.93	x		
Aldose reductase	P45376	ALDR_MOUSE	71.4296	35732.3244	6.71		x	
Alpha actinin	Q62744	Q62744_RAT	34.1625	102563.9082	5.26		x	
Annexin A5	P48036	ANXA5_MOUSE	72.7561	35752.5122	4.82		x	
Apoptotic chromatin condensation inducer 1	E9PTS9	E9PTS9_RAT	60.9463	146620.8306	5.85		x	
ATPase family AAA domain containing protein 2	G3X963	G3X963_MOUSE	76.1955	155284.6308	6.81		x	
Beta globin	A8DUP7	A8DUP7_MOUSE	3326.2580	15826.1900	7.13	x	x	x
Brain acid soluble protein 1	F1M5J2	BASP1_MOUSE	90.0474	20706.4054	4.48	x		
Calmodulin	P62204	CALM_MOUSE	2835.2180	16837.6523	4.09			x
Calmodulin-like protein 3	Q9D6P8	CALL3_MOUSE	184.4037	16701.4807	4.18			x
Calpain small subunit 1	Q64537	CPNS1_RAT	101.6249	28570.1799	5.29			x
Calreticulin	P14211	CALR_MOUSE	235.4438	47994.5869	4.33	x		
Carbonic anhydrase 3	P16015	CAH3_MOUSE	928.8158	29366.3425	6.89	x	x	
CD86 antigen	Q91YV7	Q91YV7_MOUSE	85.4951	34713.8843	5.79			x
Chromodomain Y-like protein 2	Q7TQ22	Q7TQ22_MOUSE	62.3548	35988.3261	8.88		x	
CMP sialic acid transporter	Q61420	S35A1_MOUSE	66.9004	36453.1196	8.94	x		
Cofilin 1	P45592	COF1_RAT	1181.7030	18532.5747	8.22			x
Coiled coil domain containing protein 112	A0AUP1	CC112_MOUSE	41.8482	52777.2004	9.60		x	
Collagen alpha 1 XVI chain	Q8BLX7	COGA1_MOUSE	94.2345	155805.5626	8.22			x

Exostosin-2	P70428	EXT2_MOUSE	82.7056	80269.3804	6.22	x		
Fatty acid-binding protein 4	P04117	FABP4_MOUSE	426.0494	14649.9187	8.53	x	x	
Ferritin	Q3UCL5	Q3UCL5_MOUSE	160.9769	20756.3635	5.65	x	x	
FK506 binding protein12 T2	Q1JUQ7	Q1JUQ7_MOUSE	5581.3500	4021.5120	9.18			x
Glutathione S transferase	Q6LDP3	Q6LDP3_RAT	2002.6070	25685.7171	8.27	x		
Glutathione S transferase A3	P30115	GSTA3_MOUSE	220.1696	25360.5856	8.76	x	x	
Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	P16858	G3P_MOUSE	699.9058	35810.1176	8.44			x
Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase testis specific	Q64467	G3PT_MOUSE	405.8654	47657.0855	8.14			x
Golgin subfamily B member 1	Q571K1	Q571K1_MOUSE	30.6385	220980.8270	5.19	x		
G-protein coupled receptor 124	Q91ZV8	GP124_MOUSE	66.8584	143324.2872	8.84		x	
Granulocyte macrophage colony stimulating factor receptor subunit alpha	Q00941	CSF2R_MOUSE	53.8033	41768.8217	7.97			x
Heat shock 70 kDa protein 1-like	P16627	HS71L_MOUSE	311.3844	70637.4236	5.90	x	x	x
Heat shock cognate 71 kDa protein	P63017	HSP7C_MOUSE	1022.9680	70871.1979	5.37	x	x	
Heat shock related 70 kDa protein 2	P17156	HSP72_MOUSE	376.7250	69641.7852	5.50	x	x	x
Hemoglobin subunit epsilon Y2	P02104	HBE_MOUSE	379.5198	16136.6434	7.90			x
Hepatoma-derived growth factor	P51859	HDGF_MOUSE	84.3513	26268.7141	4.80		x	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61980	HNRPK_RAT	335.0778	50976.3706	5.39			x
Histidine triad nucleotide binding protein 1	P70349	HINT1_MOUSE	300.6282	13776.9406	6.36		x	x

Hydroxyacid oxidase 2	Q9NYQ2	HAOX2_MOUSE	41.6135	38699.7591	7.55		x	
Inducible heat shock protein 70 kDa	Q61696	HS71A_MOUSE	183.1428	70079.2764	5.52	x	x	x
Inositol monophosphatase 3	Q7TPJ5	Q7TPJ5_MOUSE	62.2875	60824.0679	6.44		x	
Integrator complex subunit 10	E9Q361	E9Q361_MOUSE	50.6226	76130.0904	6.49		x	
Isoamyl acetate hydrolyzing esterase 1 homolog	Q711G3	IAH1_RAT	46.3364	28004.3515	5.63			x
Lectin-like transmembrane protein	Q588F5	Q588F5_MOUSE	119.8408	16831.2391	6.37	x		
Left right determination factor 2	P57785	LFTY2_MOUSE	51.3140	41175.3470	6.47		x	
LRRG00114 [predicted]	Q6QI94	Q6QI94_RAT	49.1164	24184.6720	8.57	x		
Magea3 protein	O89007	O89007_MOUSE	111.9699	36179.7293	4.52			x
MARCKS related protein	P28667	MRP_MOUSE	292.8251	20165.4554	4.60			x
Mast cell protease 9	Q9EPR0	Q9EPR0_MOUSE	82.0844	26636.3391	9.77			x
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4	Q561Q8	MED4_RAT	60.3414	29825.6098	4.95	x		
MHC class II antigen fragment	Q6ZZB1	Q6ZZB1_MUSSP	343.1883	9784.7840	4.16		x	
Myosin 9	Q8VDD5	MYH9_MOUSE	82.6474	226372.6048	5.54	x		
Myosin light chain 6B	Q8CI43	MYL6B_MOUSE	194.7264	22807.0670	5.41			x
Myosin light chain kinase smooth muscle	Q6PDN3	MYLK_MOUSE	461.1544	212925.9724	5.92	x		
Negative elongation factor E	P19426	NELFE_MOUSE	44.1249	41483.0550	9.40		x	x
Neutrophil cytosolic factor 1	Q811Y3	Q811Y3_RAT	61.3492	44679.9007	9.22		x	
Nuclear autoantigenic sperm protein	Q66HD3	NASP_RAT	245.1996	84200.0566	4.30			x

Nucleobindin 2	P81117	NUCB2_MOUSE	172.7944	50304.5786	5.05	x		
Nucleoside diphosphate kinase B	Q01768	NDKB_MOUSE	229.7101	17363.1163	6.97	x	x	
Peptidyl prolyl cis trans isomerase	P26883	PPIA_MOUSE	5556.5450	11922.6630	7.89			x
Perilipin 3	Q9DBG5	PLIN3_MOUSE	39.1584	47262.3165	5.45	x		
Peroxiredoxin 6	O08709	PRDX6_MOUSE	659.3919	24870.6915	5.71	x	x	
Peroxiredoxin 6-related sequence 1	Q8BG37	Q8BG37_MOUSE	158.0790	24995.8875	5.98	x		
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P70296	PEBP1_MOUSE	250.4760	20830.4876	5.19	x	x	x
Phosphoglycerate mutase 1	Q9DBJ1	PGAM1_MOUSE	487.0440	28832.0471	6.67		x	
Pleckstrin homology-like domain family B member 1	D3ZNS1	D3ZNS1_RAT	215.3763	150008.5587	9.09	x		
Profilin 1	P62962	PROF1_MOUSE	366.9221	14957.2750	8.46	x	x	
Programmed cell death protein 5	P56812	PDCD5_MOUSE	1013.4800	14275.1165	5.55			x
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3	Q6W3F0	P4HA3_MOUSE	55.3947	60975.2872	5.85	x		
Protein canopy homolog 2	Q9QXT0	CNPY2_MOUSE	233.5349	20767.4194	4.95			x
Protein CutA	Q6MGD0	CUTA_RAT	391.9628	18658.8760	6.29			x
Protein disulfide isomerase A3	P27773	PDIA3_MOUSE	261.2916	56678.4861	5.88	x	x	
Protein DJ-1	O88767	PARK7_RAT	118.6343	19974.2404	6.32	x		
Protein Fam65b	Q7TP54	Q7TP54_MOUSE	154.3684	144709.1108	5.31	x		
Protein Gm11232	Q5SPI8	Q5SPI8_MOUSE	91.0420	33386.5089	10.43	x		
Protein Gm5533 [predicted]	Q8C9X0	Q8C9X0_MOUSE	172.7122	13156.3587	9.30		x	

Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14A	Q91VC7	PP14A_MOUSE	217.4136	16648.8153	6.84			x	
Protein Pmp2	D3ZFG5	D3ZFG5_RAT	108.9685	14952.4917	9.61			x	
Protein Scamp3	E9PTW1	E9PTW1_RAT	96.7152	38524.2171	6.33		x		
Protein Trex1	Q5BK16	Q5BK16_RAT	60.6274	33603.6370	7.63		x		
Rab GDP inhibitor beta	Q61598	GDIB_MOUSE	97.8433	50537.2769	5.93			x	
Reticulocalbin 2	Q8BP92	RCN2_MOUSE	56.2469	37270.8249	4.28				x
Retinal dehydrogenase 1	P24549	AL1A1_MOUSE	89.5098	54467.9254	7.91		x		
Ribonuclease UK114	P52760	UK114_MOUSE	159.8101	14255.4436	8.73			x	
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase	O35130	NEP1_MOUSE	62.0614	26974.4299	9.10			x	
RNA polymerase II-associated protein 3	Q9D706	RPAP3_MOUSE	49.4789	74095.6760	7.99		x		
Serine-threonine protein kinase greatwall	Q8C0P0	GWL_MOUSE	36.4390	95975.1259	5.36		x		
Serologically defined colon cancer antigen 8 homolog	Q80UF4	SDCG8_MOUSE	49.1638	82978.9608	6.11			x	
Serotransferrin	P12346	TRFE_RAT	117.8903	76395.4661	7.14			x	
SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 Yeast isoform CRA c	G3UW19	G3UW19_MOUSE	6790.4350	9372.8804	9.25				x
snRNA activating protein complex subunit 3	Q5BK68	SNPC3_RAT	54.7554	46229.9373	4.81				x
Sperm surface protein Sp17	Q62252	SP17_MOUSE	2228.4830	17296.0831	4.82				x
Spermatid-specific heat shock protein 70 kDa fragment	Q9R2A1	Q9R2A1_MOUSE	211.4516	12136.9726	9.13		x	x	
S-phase kinase-associated protein 1	Q9WTX5	SKP1_MOUSE	349.5543	18672.0822	4.40				x

Stathmin	Q545B6	Q545B6_MOUSE	6447.3120	17274.4889	5.75			x
Sulfated glycoprotein 1	Q61207	SAP_MOUSE	106.9007	61422.4403	5.07			x
Superoxide dismutase Cu Zn	P08228	SODC_MOUSE	1018.3580	15942.7154	6.02			x
Thymosin beta 4	P20065	TYB4_MOUSE	1939.9950	5679.4870	5.02	x		
Toll-like receptor	C0LSK8	C0LSK8_RAT	72.8743	93408.1901	6.50		x	
Tonsoku-like protein	Q6NZL6	TONSL_MOUSE	54.9264	151108.5593	5.67		x	
Triose-phosphate isomerase	P17751	TPIS_MOUSE	743.0170	32191.8585	5.56	x	x	
Tropomyosin 2 beta	P58774	TPM2_MOUSE	290.7472	12290.7757	4.83		x	
Tubulin alpha 1B chain	P05213	TBA1B_MOUSE	843.7041	50151.7822	4.94	x		x
Tubulin alpha 1C chain	P68373	TBA1C_MOUSE	176.6592	49909.5071	4.96	x		x
Tubulin alpha 8 chain	Q9JJZ2	TBA8_MOUSE	58.9091	50051.6615	4.98	x		
Tubulin beta 6 chain	Q922F4	TBB6_MOUSE	617.3660	50090.5500	4.78			x
Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	Q66JP1	Q66JP1_MOUSE	2765.8040	14728.3645	9.87	x		x
Ubiquitin B	Q6NZC5	NZC5_MOUSE	1517.6620	34362.6330	7.80	x	x	
Ubiquitin C	F1M0Q4	F1M0Q4_RAT	707.8765	9477.9838	9.35	x	x	
Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase isozyme L1	Q00981	UCHL1_RAT	749.9859	24838.3372	5.14			x
Ubiquitin-40 S ribosomal protein S27a	P62983	RS27A_MOUSE	440.3522	18077.9017	9.68	x	x	x
Ubiquitin-60 S ribosomal protein L40	P62984	RL40_MOUSE	421.7773	14072.6538	9.87	x	x	x
Ubiquitin-fold modifier 1	P61961	UFM1_MOUSE	282.7551	9117.5951	9.36	x		

Vinculin	Q64727	VINC_MOUSE	74.9221	116717.6834	5.77	x	
WD repeat-containing protein 52	E9Q5M6	E9Q5M6_MOUSE	80.2302	211546.0044	5.39	x	
Whirlin	Q80VW5	WHRN_MOUSE	45.7991	98012.3469	8.20		x
Y box protein 2	B2RUF0	B2RUF0_MOUSE	544.6198	38080.3980	10.75		x
