

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

MARIA FERNANDA SILVA DE ALMEIDA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO EPIDÍDIMO EM
RESPOSTA À EXPOSIÇÃO POR
CONTAMINANTES AMBIENTAIS**

Bauru
2015

MARIA FERNANDA SILVA DE ALMEIDA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO EPIDÍDIMO EM
RESPOSTA À EXPOSIÇÃO POR
CONTAMINANTES AMBIENTAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para graduação em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf.

Bauru
2015

A447a Almeida, Maria Fernanda Silva de

Análise proteômica do epidídimo em resposta à exposição por contaminantes ambientais / Maria Fernanda Silva de Almeida. -- 2015.

90f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Análise proteômica. 2. Contaminantes ambientais. 3. Toxicologia ambiental. I. Buzalaf, Camila Peres. II. Título.

MARIA FERNANDA SILVA DE ALMEIDA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO EPIDÍDIMO EM RESPOSTA À
EXPOSIÇÃO POR CONTAMINANTES AMBIENTAIS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de biomédica, sob orientação da Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Me. Márcia Clélia Leite Marcellino
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 02 de Dezembro de 2015

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais e à todas as pessoas que me motivaram e me ajudaram a cumprir mais um objetivo de vida. A todos vocês, quem ajudaram a conquistar essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por nunca me abandonar, por ter me dado força em todas as noites em claro, e esperança para que eu não desistisse. Agradeço por não me esquecer e sempre alegrar meu dia com algo simples. Obrigado por me encorajar em todos os momentos, mesmo quando tudo estava difícil.

Agradeço minha família por ter me dado apoio e confiança nessa jornada. Obrigado Vô Braz pelo teu sonho, que hoje se realizou, gostaria muito de te agradecer pessoalmente, um dia. Obrigado pai, por sua sabedoria ao me orientar nas decisões. Obrigado mãe por ser sabia e gentil ao me educar e sempre estar disposta a me ouvir e a me aconselhar. Agradeço aos meus irmãos, que são minha sustentação, e meus exemplos.

Agradeço a esta instituição de ensino Universidade do Sagrado Coração, professores e colaboradores, por ter me oferecido conhecimento e estrutura, visando meu engrandecimento profissional.

Agradeço a Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Dra. Aline de Lima Leite e todos os professores da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, por terem disponibilizado o laboratório de bioquímica e o espectrômetro de massas, e por terem me auxiliado. Vocês foram fundamentais para o êxito deste trabalho.

Agradeço principalmente a Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf, por me orientar com paciência, zelo e atenção. Obrigado por ter se disponibilizado a uma “missão contra o tempo”. Todos os instantes que passamos juntas foram como uma nova graduação de conhecimentos, profissionais e pessoais; agradeço por ser minha inspiração de mulher, pesquisadora, professora e amiga.

Agradeço as minhas vizinhas Natália Bittencourt, Ana Iscuissati e Maria Fernanda Doná, por terem me ajudado com palavras doces, e por terem paciência comigo todos os dias.

Agradeço a todos os amigos, e pessoas que de forma direta ou indiretamente me ajudaram e apoiaram para esta conquista. A todos vocês meu muito obrigado.

“Então tomou Samuel uma pedra, e a pôs entre Mizpá e Sem, e chamou o seu nome Ebenézer e disse: até aqui nos ajudou o Senhor.”

I Samuel 7:12

RESUMO

O metilmercúrio (meHg) e bisfenóis policlorinados (PCBs) constituem contaminantes encontrados em diversos compartimentos ambientais, com grande capacidade de bioacumulação e biomagnificação, com impacto no sistema reprodutivo. Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos pelos processos de espermatogênese e espermiogênese. Após a síntese, os mesmos são direcionados ao epidídimo, onde sofrem o processo de maturação que confere aos espermatozoides a aquisição da mobilidade celular e a capacidade de fertilização. Esse processo é dependente da interação de proteínas secretadas pelo epitélio epididimal com as proteínas espermáticas, as quais passam por diversas modificações pós-translacionais durante o trânsito no epidídimo. No entanto, pouco se sabe sobre o perfil proteico do epidídimo de ratos em resposta à exposição ao meHg associado ou não com os PCBs, em doses que mimetizam àquelas provocadas por intoxicações em humanos. O objetivo foi avaliar, qualitativa e quantitativamente, as proteínas do epidídimo em ratos expostos com duas combinações de doses, por análise proteômica. Os resultados demonstraram que a exposição aos contaminantes alterou significativamente a expressão de proteínas principalmente envolvidas nos processos de informação gênica e na transmissão de sinais. Assim, o trabalho abre perspectivas futuras para a confirmação dos efeitos dessas proteínas na atividade funcional dos espermatozoides frente à toxicidade, as quais podem servir como biomarcadores moleculares de toxicidade reprodutiva masculina e infertilidade.

Palavras- chave: Análise proteômica, contaminantes ambientais, toxicologia ambiental.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) and bisfenóis policlorinados (PCBs) are contaminants found in various environmental compartments, with great capacity for bioaccumulation and biomagnification, with impact on the reproductive system. Sperm are produced in the seminiferous tubules of the testes by spermatocytogenesis processes. After synthesis, they are directed to the epididymis, where they undergo the process of maturation that gives sperm the acquisition of cell motility and fertilization capacity. This process is dependent on the interaction of proteins secreted by the epithelium with epididymal sperm proteins which undergo various post-translational modification during transit through the epididymis. However, little is known about the protein profile of the epididymis of mice in response to exposure to MeHg or not associated with PCBs at doses that mimic those caused by poisoning in humans. The objective was to evaluate qualitatively and quantitatively, epididymal proteins in rats exposed to two combinations of doses, for proteomic analysis. The results demonstrated that exposure to contaminants significantly altered the expression of proteins involved especially in gene information processing and signal transmission. Thus, the work opens prospects for confirmation of effects on functional activity of these proteins the front sperm toxicity, which can serve as molecular biomarkers of male infertility and reproductive toxicity.

Key words: proteomics analysis, environmental contaminants, environmental toxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sistema reprodutor masculino de mamíferos	13
Figura 2: Diagrama de Venn das comparações entre os grupos.....	21
Figura 3: Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e meHg (0,05 mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1 mg/Kg/dia). As categorias estão apresentadas baseada na ontologia gênica de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo <i>software</i> Cytoscape® 3.2.1. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa=0.5$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....	23
Figura 4: Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e meHg (0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia). As categorias estão apresentadas baseada na ontologia gênica de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo <i>software</i> Cytoscape® 3.2.1. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa=0.45$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais	17
Tabela 2: Número de proteínas com alterações de expressão	20
Tabela 3: Número de proteínas exclusivas de todas as comparações.	20
Tabela 4: Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no epidídimo na comparação entre os grupos controle e metilHg(0,05 mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1 mg/Kg/dia).....	31
Tabela 5: Proteínas exclusivas no epidídimo na comparação entre os grupos controle e meHg(0,05 mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1 mg/Kg/dia).	35
Tabela 6: Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no epidídimo na comparação entre os grupos controle e meHg(0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1 mg/Kg/dia).....	60
Tabela 7: Proteínas exclusivas no epidídimo na comparação entre os grupos controle e meHg(0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia).	65

LISTA DE ABREVIATURAS

PCBs: Bisfenóis policlorinados

MetilHg: Metilmercúrio

Hg²⁺: Íon mercúrio

HgCl₂: Cloreto de mercúrio

mRNA: Acido ribonucléico mensageiro

e.g.: do latim, por exemplo

Aroclor: nome comercial de um PCBs

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DPN: dia pós natal

N₂: Nitrogênio

M: Molar

mM: Milimolar

DTT: Dithiotheitol

ACN: Acetonitrila

PLGS: software ProteinLynx Global Service

IPA: softwareIngenuityPathwayAnalysis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	17
3.2	ANÁLISE PROTEÔMICA DO EPIDÍDIMO	17
3.2.1	Coleta do epidídimo.....	17
3.2.2	Análise Proteômica.....	18
3.2.3	Análise por nanoUPLC acoplado a espectrometria de massas.....	18
3.2.4	Quantificação livre de marcadores (“ <i>label-free</i> ”)	19
3.2.5	Análise dos dados por bioinformática	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1	ANÁLISE PROTEÔMICA.....	20
4.2	CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL.....	21
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
	REFERÊNCIAS.....	27
	APÊNDICE A	31
	APÊNDICE B.....	35
	APÊNDICE C	60
	APÊNDICE D	65
	ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

A era da industrialização, na qual grande parte dos produtos são produzidos quimicamente, constitui um meio para proporcionar facilidade à vida diária da população. No entanto, o aumento de produtos industrializados corroborou para o aumento dos danos ao meio ambiente e à saúde das pessoas. O metilmercúrio e o bisfenóis policlorinados (PCBs) são exemplos de substâncias encontradas no ambiente com impactos negativos a essas duas esferas, apresentando, e múltipla instância, consequências prejudiciais à saúde humana (Crespo-Lopez, Macedo *et al.*, 2011; Ellsworth, Mamula *et al.*, 2015; Kania-Korwele Lehmler, 2015).

O mercúrio metálico em contato com a atmosfera pode ser oxidado pelo ozônio ou outros oxidantes atmosféricos e transformado em íon mercúrio (Hg^{2+}). Esse, por sua vez, pode complexar-se com outros íons presentes no ambiente, como o cloreto, e formar HgCl_2 , que se deposita na água e no solo, podendo formar metilmercúrio (metilHg), forma mais tóxica (Tchounwou, Newsome *et al.*, 2003).

A intoxicação humana causada pelo metilHg ocorre principalmente pela ingestão de peixes, frutos do mar e derivados contaminados (Mahaffey, Clickner *et al.*, 2009; Chen, 2012; Oken, Choi *et al.*, 2012; Sunderlande Selin, 2013). Os níveis tóxicos ocorrem a partir da ingestão de 0,5mg por kg de peso corporal. Após a ingestão, a substância é absorvida e distribuída por todos os tecidos do corpo humano, possuindo tempo de meia-vida biológica longa. Já a contaminação pelos PCBs ocorre pela ingestão e contato com a água, sedimentos e alimentos contaminados. Ambos, metilHg e PCBs são agentes tóxicos persistentes no ambiente e sofrem biomagnificação ao longo da cadeia trófica. Uma vez que o metilHg e os PCBs frequentemente ocorrem juntos no ambiente, as possíveis formas de interação destes químicos, tais como efeitos aditivos, sinérgicos ou antagonistas, devem ser amplamente investigadas (Cory-Slechta, 2005). Estudos *in vitro* (Bemise Seegal, 1999; 2000; 2004) e *in vivo* (Roegge, Wan *et al.*, 2004; Roegge Schantz, 2006) têm sugerido efeito sinérgico. No entanto, estes dados são ainda controversos (Widholm, Villareal *et al.*, 2004; Vitalone, Catalaniet *al.*, 2010; Coccini, Roda *et al.*, 2011).

Os danos tóxicos incluem desde comprometimento do córtex visual (Dasari e Yuan, 2009), neurotoxicidade (Altmann, Mundy *et al.*, 2001; Murata, Grandjean *et al.*, 2007) e até disfunções reprodutivas masculinas com acometimento da espermatogênese e da esteroidogênese testicular (Homma-Takeda, Kugenuma *et al.*, 2001; Fossato Da

Silva,Teixeira*etal.*,2011; Petersen,Halling*etal.*,2015). A desregulação endócrina também constitui um dos efeitos tóxicos desses contaminantes (Wang,Chang*etal.*,2006;Li,2007). Presente em alguns pesticidas, os PCBs interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios (Wang,Chang *etal.*,2006), os quais são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos.

Os avanços da vida moderna têm sido acompanhados por variados impactos ambientais com implicações na saúde humana. Dentre esses, o aumento dos casos de infertilidade masculina, constitui um problema comum em todoo mundo (Pant, Pant*etal.*,2013;Gao,Mruk*etal.*,2015). Na maioria dos casos, a etiologia da infertilidade ainda permanece desconhecida. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a avaliação da fertilidade masculina deve ser realizada pela análise do sêmen convencional, com foco no número, na morfologia e no percentual de motilidade dos espermatozoides, bem como no número de leucócitos (WHO,2010). No entanto, seu valor preditivo para avaliar a qualidade do esperma e fertilidade é limitado (Cooper, Noonan*etal.*,2010; Esteves,Zini*etal.*,2012). Assim, o diagnóstico e a compreensão da causa da infertilidade masculina idiopática passaram a ser avaliados por técnicas moleculares objetivando avaliar a expressão de proteínas essenciais com função na regulação da fertilização.

O sistema reprodutor masculino da maioria dos mamíferos é composto por testículos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias (como próstata e vesícula seminal) e pênis (SOKOL, 1997), demonstrado na figura 1:

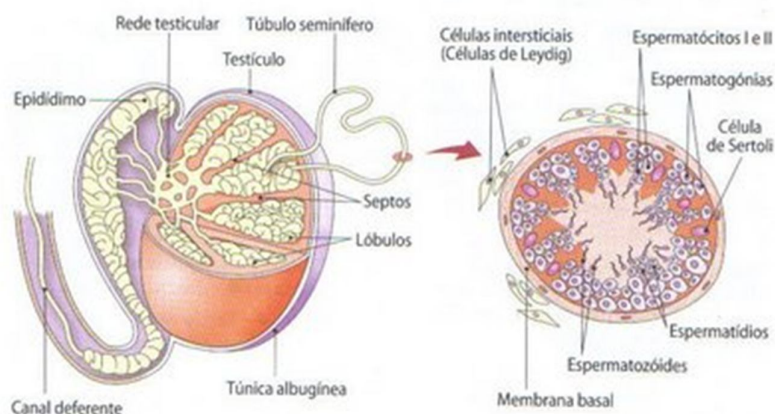


Figura 1: Sistema reprodutor masculino de mamíferos

Fonte: Hormonas em acção

A espermatogênese, que ocorre nos testículos, é um processo celular altamente coordenado e regulado. É responsável por transformar as espermatogônias, células diplóides indiferenciadas, em espermátides haplóides, que após sofrer o processo de diferenciação celular, são citodiferenciadas em espermatozóides. Essas células são altamente especializadas, alongadas e terminalmente diferenciadas, capazes de transportar o genoma paterno para o ovócito durante a fecundação. A maturação pós-testicular, que ocorre no epidídimo, é caracterizada pelas modificações nos espermatozóides, onde apenas uma quantidade mínima de organelas citosólicas é mantida, com impacto na perda completa da sua capacidade transcricional. No entanto, durante o transporte pelo epidídimo, os espermatozóides passam por uma série de modificações pós-traducionais que lhes conferem um grande número de proteínas estrutural e funcionalmente competentes (Gatti, Castella *et al.*, 2004).

O produto inicial da expressão gênica em um organismo é conhecido como transcriptoma e se caracteriza por uma coleção de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) cuja informação biológica é requerida pela célula em um determinado momento. Essas moléculas de mRNA são sintetizadas a partir de genes que codificam as proteínas e direcionam a síntese do produto final da expressão gênica, o proteoma (Domone Aebersold, 2006). Assim, este corresponde à avaliação da expressão múltipla das proteínas codificadas pelo genoma, que especifica a natureza das reações bioquímicas que a célula está apta a realizar. Com a completa codificação do genoma, um grande desafio é entender a função de todos os produtos gênicos e como eles contribuem para formar um organismo ou tecido viáveis.

O fato de os espermatozóides apresentarem uma capacidade limitada de biossíntese, a análise do transcriptoma como um método de escolha para investigar as alterações pós-testiculares não é recomendado. No entanto, novos avanços em proteômica abriram possibilidades no entendimento geral da dinâmica da função dessa célula, com impacto na reprodução. Ainda estão a ser feitos esforços contínuos para identificar proteínas nucleares de espermatozóide, as proteínas necessárias para a motilidade do espermatozóide, proteínas da membrana requeridas para capacitação, interação com o ovócito e fecundação (Jassim, Gillott *et al.*, 1992; Yoshii, Kujietal., 2005; Zhao, Huo *et al.*, 2007; De Mateo, Castillo *et al.*, 2011; Ashrafzadeh, Karsani *et al.*, 2013; Wang, Guo *et al.*, 2013; Castillo, Amaral *et al.*, 2014).

O epidídimo é um órgão do aparelho genital masculino formado por um ducto delgado altamente contorcido que conecta o ducto deferente, por onde os

espermatozoides recém-sintetizados nos túbulos seminíferos chega ao epidídimo, até o ducto eferente, por onde os mesmos são levados até a próstata para se associar ao conteúdo das vesículas (Sullivan, Saez *et al.*, 2005). É composto por três regiões anatômicas: cabeça, corpo e a cauda. Está relacionado a uma variedade de funções incluindo o transporte, proteção, maturação, concentração e armazenamento do esperma (Rodríguez, 2002).

O lúmen do epidídimo das regiões da cabeça e do corpo é o micro ambiente no qual os espermatozoides adquirem motilidade e fertilidade através do processo de maturação o qual se dá a partir da interação entre as proteínas sintetizadas e secretadas pelo epitélio do epidídimo e do esperma em maturação (Klinefelter, Welch *et al.*, 2002; Toshimori, 2003). Essas últimas sofrem ainda as modificações pós-translacionais, as quais demonstram ser importantes para a maturação espermática e aquisição do potencial fertilizante. Essas modificações incluem fosforilação, glicosilação e processos celulares das proteínas espermáticas durante o trânsito pelo epidídimo resultando em alterações na função protéica e na localização que levam à maturação dos espermatozoides. Após o processo de maturação, os espermatozoides alcançam a região da cauda onde eles são armazenados e mantidos em estado quiescente até o momento da ejaculação. Cada uma das regiões possui perfis de expressão gênica diferenciados (Jelinsky, Turner *et al.*, 2007), que distinguem as proteínas secretadas no lúmen (Belleannee, Labas *et al.*, 2011), estabelecendo compartimentos fisiológicos que afetam direta e indiretamente a maturação (Saez, Frenette *et al.*, 2003; Belleannee, Labas *et al.*, 2011).

Assim, alterações no tempo de trânsito podem resultarem problemas na maturação espermática e no número de gametas durante a ejaculação (Klinefelter, Welch *et al.*, 2002). Vários trabalhos demonstraram que a exposição a contaminantes químicos está associada a efeitos adversos na reprodução experimental e humana masculina incluindo a diminuição da qualidade espermática (Bay, Asklund *et al.*, 2006; Nordkap, Carlsen *et al.*, 2012). Embora o epidídimo seja considerado um órgão-alvo do efeito tóxico de várias substâncias (Klinefelter e Suarez, 1997), pouco se sabe ainda sobre os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida pelo metilHg e bisfenóis, que poderão contribuir para a descoberta de biomarcadores de toxicidade por esses toxicantes ambientais.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Atualmente, as águas e alimentos estão contaminadas por poluentes ambientais como por exemplo, o metilHg e PCBs, em maior ou menor grau. Como consequência, quanto maior o seu consumo, maior a exposição individual a esses compostos. Nesse contexto, embora a literatura é vasta com relação aos estudos envolvendo o efeito tóxico desses compostos sobre o sistema reprodutivo masculino, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos moleculares pelos quais os contaminantes ambientais afetam a maturação dos espermatozoides, que podem estar relacionados com a infertilidade masculina. Assim, o objetivo desse projeto é avaliar os perfis protéicos envolvidos na resposta toxicológica no epidídimo de ratos após a exposição aos contaminantes ambientais, metilHg e PCBs, em associação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Ratos da linhagem Wistar, machos (n=30, 21 dias de idade), foram adquiridos e mantidos no biotério da Universidade do Sagrado Coração, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C). Os animais receberam água e ração para roedores à vontade. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê local de Ética no Uso de Animais (CEUA # 1289080915, anexo). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=10/grupo), especificados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos experimentais

<i>Grupos Experimentais</i>	
Grupo 1 (G1, n=10)	Controle Negativo
Grupo 2 (G4, n=10)	MeHg (0,05mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1mg/Kg/dia)
Grupo 3 (G5, n=10)	MeHg (0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia)

As doses escolhidas de MeHg (solução comercial, Merck[®]) foram consideradas baixas doses e foram baseadas em estudos prévios (Passos et al., 2008, Grotto et al., 2011, Guo et al., 2012). A escolha das doses de PCBs, produto comercial Aroclor (Sigma Aldrich[®]) foi baseada na dose NOAEL (“*no observed adverse effectlevel*”) deste composto (Gray et al., 1993). Os químicos foram diluídos em óleo de milho e administrados diariamente por gavagem (volume de 1ml/Kg). O tratamento dos machos foi realizado do dia pós-natal (DPN) 23 ao DPN 53, de acordo com protocolo sugerido pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América (US EPA, 2004), para estudo de toxicidade juvenil. Os animais foram pesados e submetidos à avaliação clínica a cada dois dias durante todo o período experimental. No DPN 53, 10 animais/grupo experimental foram eutanasiados para a determinação do perfil proteico.

3.2 ANÁLISE PROTEÔMICA DO EPIDÍDIMO

3.2.1 Coleta do epidídimo

No DPN 53, foi realizada a coleta do epidídimo direito e os mesmos foram imediatamente congelados em N₂ líquido e mantidos a -80°C até o momento da avaliação.

3.2.2 Análise Proteômica

Os epidídimos foram homogeneizados em N₂ líquido e as proteínas foram extraídas com tampão de extração contendo uréia 6M e thiuréia 2M em água, acrescido de DTT 100 mM, por 1 hora no vórtex a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a seguir, foi realizado um *pool* de três amostras por grupo, resultado em 3 amostras finais a serem submetidas à análise. Foi acrescido às amostras, solução de AMBIC 50mMe uréia 3M até completar o volume de 1000µl. Após esse procedimento, as mesmas foram submetidas ao amicon para concentração das proteínas e troca de solvente sob centrifugação a 5000 rpm a 20°C.

Após esse período, foi realizada a quantificação de proteínas totais a concentração ajustada para 50ug/50µl. As volumes correspondentes foram transferidas para um novo microtubo (Axygen) e 10 µl de AMBIC 50 mM foi adicionado às amostras seguido de 25 µl da solução RapiGest SF a 0.2 % (Waters). A solução foi incubada em bloco aquecido (37°C) por 30min e feito spin. A seguir, foi adicionado 2.5µl de DTT 100 mM, com agitação de vórtex, à solução foi incubada em bloco aquecido (37°C) por 60 min. Após a amostra ter resfriado à temperatura ambiente, 2.5µl de iodoacetamida 300 mM foi adicionada e incubada no escuro por 30 min. A digestão protéica foi realizada pela adição de tripsina (50 ng/µl) a 37°C *overnight*. Após a digestão, 10 µl de ácido trifluoroacético a 5% foi adicionado, agitado em vórtex e incubado a 37 °C por 90 min com o objetivo de hidrolisar o RapiGest. A amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 30 min a 6°C e o sobrenadante foi transferido para um outro microtubo (Waters Total Recovery vial- Waters).

3.2.3 Análise por nanoUPLC acoplado a espectrometria de massas

As amostras foram analisadas em triplicata. Todos os experimentos foram realizados no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo QToF G2 (Waters). Inicialmente, foi realizada uma separação em nanoescala com o sistema UPLC nanoACQUITY equipado com uma coluna C₁₈ do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 2,1 mm×50 mm; 1,8 µm, Waters). A coluna foi pré-equilibrada com a fase móvel B (Acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1%) e em seguida os peptídeos foram separados pro gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,4 µL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C. A análise de peptídeos trópticos foi realizada no espectrômetro de massas Xevo G2 QToF, operando no modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 70 min. Os dados obtidos foram processados através do *software ProteinLynx GlobalServer*

(PLGS) versão 3.0 (Waters). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*, que foi buscado no banco de dados da espécie *Rattus norvegicus* baixado do catálogo do *UniProt* (Universal Protein Resource). As alterações quantitativas em níveis protéicos foram analisadas utilizando-se o PLGS Expression E, de acordo com as intensidades de pico dos íons peptídicos medidos.

3.2.4 Quantificação livre de marcadores (“label-free”)

A quantificação livre de marcadores foi feita utilizando o *software ProteinLynx Global Service* (PLGS, v 2.2.5, Waters). Todas as proteínas identificadas com um *score* com confiança maior que 95% foram incluídas na análise quantitativa. Os peptídeos idênticos de cada triplicata por amostra foram agrupados com base na precisão de massa (< 10 ppm) e numa tolerância de tempo de retenção <0,25 minutos, usando o *software* de agrupamento incluso no PLGS v. 2.3. Foi feita uma normalização usando a função de autonormalização do PLGS. A significância das razões de expressão relativa foram calculadas usando o algoritmo Monte-Carlo e expressas como $p < 0,05$ para as proteínas subreguladas e $p > 0,95$ para as proteínas superreguladas, respectivamente. Apenas proteínas identificadas em 2 das 3 corridas foram selecionadas para as análises subsequentes.

3.2.5 Análise dos dados por bioinformática

Com o objetivo de compreender o significado biológico dos resultados quantitativos da análise proteômica, as listas de proteínas diferencialmente alteradas nas comparações entre os diferentes grupos experimentais foram submetidas a análise de interação de vias e classificação funcional *Gene Ontology* (GO) através do programa ClueGO v2.0.7 + Clupedia v1.0.8, Cytoscape plugin (cytoscape version 3.2.1).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE PROTEÔMICA

As alterações de expressão protéica foram determinadas nas comparações entre os grupos controle e expostos às associações MeHg (0,05mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1mg/Kg/dia), denominada I ou MeHg (0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia), denominada II. Foram identificadas 709 proteínas nas comparações I e II, respectivamente. Destas referentes à comparação I, 128 proteínas apresentaram diferença de expressão e 581 se mostraram exclusivas (no grupo controle ou experimental). Com relação à comparação II, 118 proteínas tiveram alteração significativa de expressão enquanto 613 proteínas são exclusivas aos respectivos grupos. As tabelas 2 e 3 indicam a quantidade de proteínas encontradas nas duas comparações.

Tabela 2: Número de proteínas com alterações de expressão

Comparação	Número de proteínas com alteração de expressão
Controle VS. MeHg (0,05mg/Kg/dia)+ Aroclor (0,1mg/Kg/dia)	128
Controle VS. MeHg (0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia)	118

Tabela 3: Número de proteínas exclusivas de todas as comparações.

Grupos	Número de proteínas exclusivas na comparação	
	I	II
Controle	482	490
MeHg (0,05mg/Kg/dia)+ Aroclor (0,1mg/Kg/dia)	99	–
MeHg (0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia)	–	123

Esses dados indicam que a associação dos tóxicos nas menores doses induziu ao aumento de proteínas com diferença de expressão e menor número de proteínas exclusivas. Com relação a essas proteínas, a maioria delas se mostraram presentes no

grupo controle. Portanto, a contaminação com meHg e Aroclor resultou em perda da expressão de ~83% e ~80% das proteínas, respectivamente nas comparações I e II.

No diagrama de Venn (Figura 2), observa-se as relações de alteração de expressão indicadas nas tabelas acima

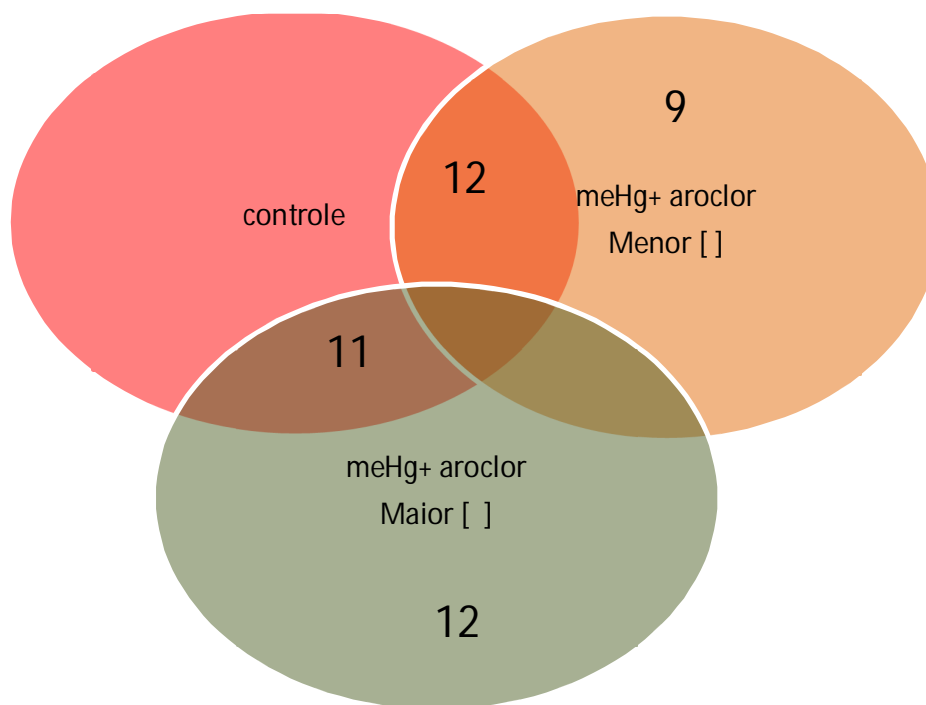


Figura 2: Diagrama de Venn das comparações entre os grupos

Nos apêndices podemos observar as tabelas com todas as proteínas descritas para cada relação.

4.2 CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL

Para cada concentração foi realizada a classificação funcional como descrita em material e métodos. As figuras 3 e 4 mostram as categorias referentes às comparações I e II, respectivamente. Nesta figura podemos observar que os termos com maiores porcentagem de genes estão relacionados ao metabolismo.

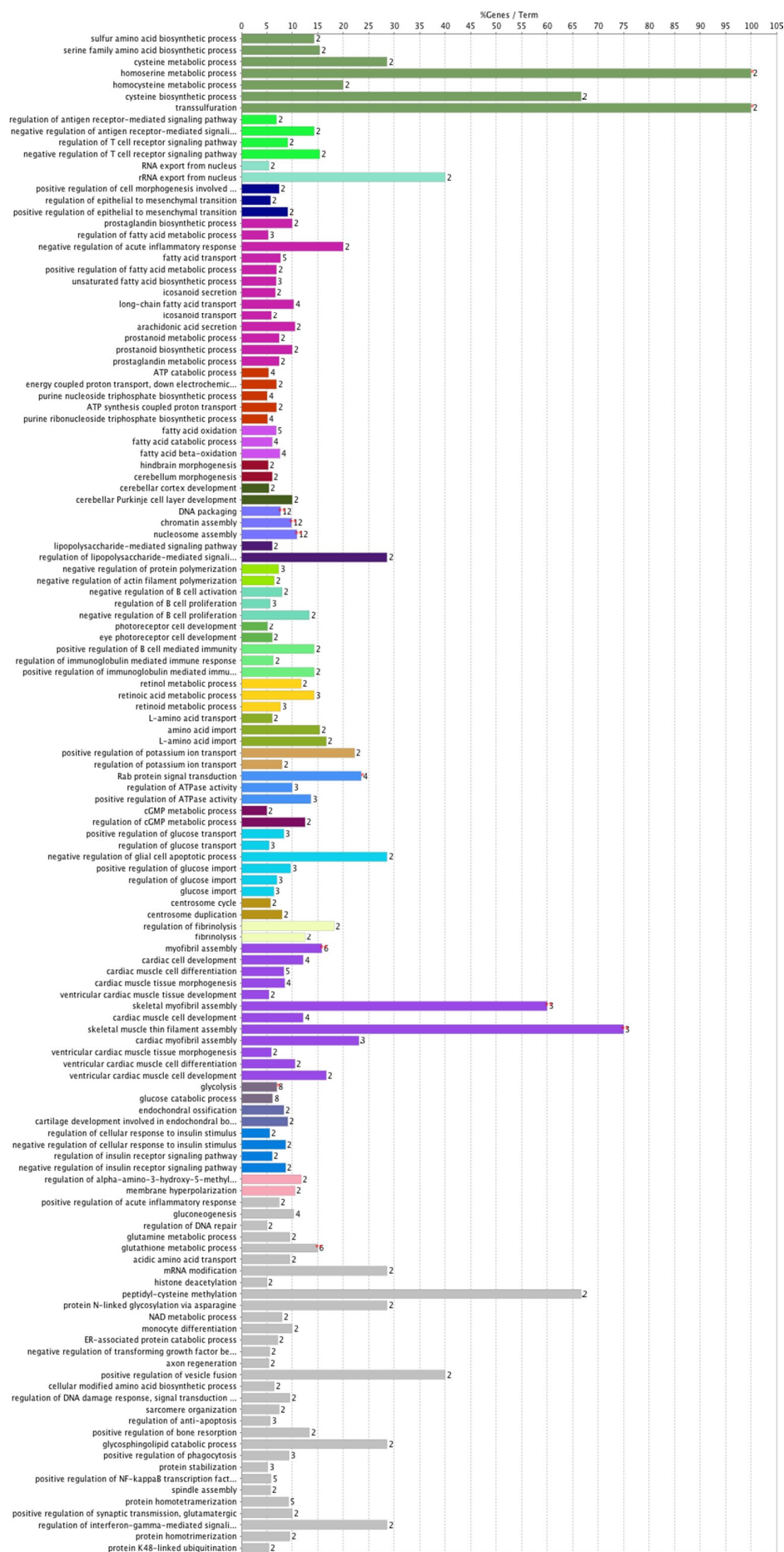


Figura 3: Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e meHg (0,05 mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1 mg/Kg/dia). As categorias estão apresentadas baseada na ontologia gênica de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo *software* Cytoscape® 3.2.1. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa=0.5$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

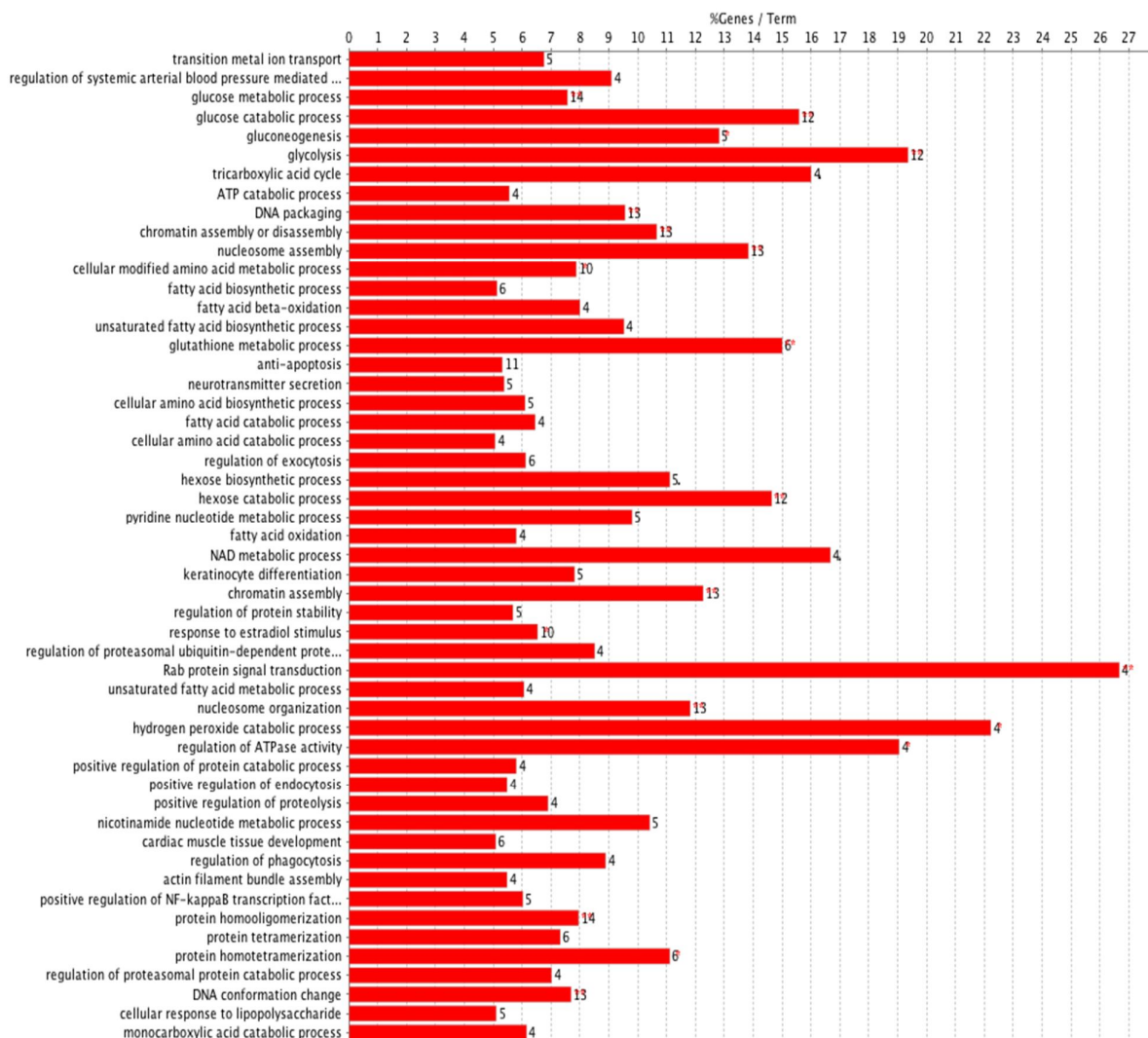


Figura 4: Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e meHg (0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia). As categorias estão apresentadas baseada na ontologia gênica de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo *software* Cytoscape® 3.2.1. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa=0.45$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

Devido ao grande número de proteínas encontradas, optou-se por discutir os resultados dando ênfase às proteínas possivelmente relacionadas à toxicidade e às

modificações transduccionais, fenômenos importantes que ocorrem durante o trajeto dos espermatozoides no epidídimo.

Diferentes subtipos de histonas foram encontradas em menor quantidade nos grupos intoxicados. As histonas são proteínas encontradas no núcleo das células eucarióticas com função de empacotar DNA em unidades estruturais chamadas nucleossomos como também na regulação de genes. Essas proteínas apresentam modificações postranslacionais, as quais alteram a interação com o DNA e proteínas nucleares, regulando diversos processos biológicos como regulação gênica, reparo de DNA, condensação cromossômica durante a mitose e espermatogênese (durante a meiose). Nesse sentido, foi mostrado que a fosforilação das histonas do esperma está envolvido na condensação da cromatina que ocorre durante a transformação do espermatozoide no epidídimo. Aproximadamente 15% do DNA genômico de esperma humano permanece ligada ao histonas (92-95), e modificações pós-tradução destas histonas restantes poderiam ter profunda importância funcional. Estudos descobriram que os locais genômicos das histonas residuais não estão localizados aleatoriamente (96-99), fornecendo evidências de que as suas modificações podem ter consequências críticas, como a esterilidade. Esses trabalhos permitem sugerir que a exposição aos contaminantes meHg e aroclor, mesmo em baixas concentrações, interferem na condensação da cromatina dos espermatozóides, os quais podem ter implicações na fertilidade.

A análise funcional revelou a presença de proteínas associadas ao metabolismo. Encaixam-se nesta categoria, por exemplo, proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, carboidratos, síntese de energia lipídeos e ácidos graxos (RISON; HODGMAN e THORNTON, 2000). De maneira geral, proteínas relacionadas ao metabolismo são compreendidas como aquelas cuja função está relacionada com a obtenção de energia e degradação de macromoléculas, além de pequenas moléculas. Portanto, as alterações de expressão nessas proteínas sugerem que o metabolismo pode ser significativamente alterado quando da exposição ao metilHg em associação com aroclor, interferindo na síntese proteica.

O epidídimo está envolvido no transporte, armazenamento e maturação do esperma. Esta inclui uma série de modificações bioquímicas sofridas pelos espermatozóides do epidídimo, essenciais para a aquisição de capacidade fertilizante e motilidade (Cooper e Yeung, 2006). O epitélio do epidídimo secreta vesículas membranosas, chamados epididimosomas, onde uma mistura complexa de proteínas

está associada. Estas vesículas possuem a função de transferir proteínas selecionadas aos espermatozoides, envolvidas na maturação. Dentre essas proteínas incluem-se Elongation factor 1-alpha 1, Interferon induced transmembrane protein 1, Ras-related protein Rab-2, Ubiquitin e Annexin (Thimon V et al., 2008). Os resultados demonstraram que essas proteínas se mostraram ausentes no grupo intoxicado, sugerindo que a maturação dos espermatozoides é prejudicada pelos contaminantes ambientais.

O perfil das proteínas não foi altamente alterado entre os grupos experimentais, em função das doses. Isso demonstra que doses bastante baixas já são eficientes em induzir toxicidade e alterar a maturação dos espermatozoides. No entanto, ainda permanece desconhecido a correlação desses perfis protéicos sobre a alteração funcional dos mesmos, como seu número e motilidade. Além disso, o efeito individual de cada contaminante sobre a alteração proética no epidídimo não pode ser inferida já que a contaminação experimental foi realizada apenas em associação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a contaminação experimental por metilHg e Aroclor, independente da combinações de doses, induz alteração qualitativa e quantitativa de proteínas no epidídimo de ratos. Esse trabalho abre perspectivas futuras no sentido de extrapolar o seu significado biológico funcional e na descoberta de biomarcadores de toxicidade e /ou de infertilidade masculina.

REFERÊNCIAS

- Altmann, L., W. R. Mundy, *et al.* Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on long-term potentiation and [3H]MK-801 binding in occipital cortex and hippocampus. Toxicol Sci, v.61, n.2, Jun, p.321-30. 2001.
- Ashrafzadeh, A., S. A. Karsani, *et al.* Mammalian sperm fertility related proteins. Int J Med Sci, v.10, n.12, p.1649-57. 2013.
- BRANDÃO, R., BORGES, L. P., DE OLIVEIRA, R., ROCHA, J. B., NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide protects against hematological and immunological alterations induced by mercury in mice. **J Biochem Mol Toxicol**. 22(5):311-9, 2008.
- Bay, K., C. Asklund, *et al.* Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, v.20, n.1, Mar, p.77-90. 2006.
- BHALLA, U. S., YENGAR, R., (1999) Emergent properties of networks of biological signaling pathways, *Science*, **283**, 381-387.
- Belleannee, C., V. Labas, *et al.* Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. J Proteomics, v.74, n.1, Jan 1, p.59-78. 2011.
- Bemis, J. C. e R. F. Seegal. Polychlorinated biphenyls and methylmercury act synergistically to reduce rat brain dopamine content in vitro. Environ Health Perspect, v.107, n.11, Nov, p.879-85. 1999.
- Castillo, J., A. Amaral, *et al.* Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. Andrology, v.2, n.3, May, p.326-38. 2014.
- Chen, C. Methylmercury effects and exposures: who is at risk? Environ Health Perspect, v.120, n.6, Jun, p.A224-5. 2012.
- Crespo-Lopez, M. E., G. L. Macedo, *et al.* Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations. Environ Int, v.37, n.1, Jan, p.136-41. 2011.
- Coccini, T., E. Roda, *et al.* Developmental exposure to methylmercury and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) affects cerebral dopamine D1-like and D2-like receptors of weanling and pubertal rats. Arch Toxicol, v.85, n.10, Oct, p.1281-94. 2011.
- Cory-Slechta, D. A. Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk? Neurotoxicology, v.26, n.4, Aug, p.491-510. 2005.
- Cooper, T. G., E. Noonan, *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update, v.16, n.3, May-Jun, p.231-45. 2010.
- Dasari, S. e Y. Yuan. Low level postnatal methylmercury exposure in vivo alters developmental forms of short-term synaptic plasticity in the visual cortex of rat. Toxicol Appl Pharmacol, v.240, n.3, Nov 1, p.412-22. 2009.

De Mateo, S., J. Castillo, *et al.* Proteomic characterization of the human sperm nucleus. Proteomics, v.11, n.13, Jul, p.2714-26. 2011.

Domon, B. e R. Aebersold. Mass spectrometry and protein analysis. Science, v.312, n.5771, Apr 14, p.212-7. 2006.

Ellsworth, R. E., K. A. Mamula, *et al.* Abundance and distribution of polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast tissue. Environ Res, v.138, Apr, p.291-7. 2015.

Esteves, S. C., A. Zini, *et al.* Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. Urology, v.79, n.1, Jan, p.16-22. 2012.

Fossato Da Silva, D. A., C. T. Teixeira, *et al.* Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. Reprod Toxicol, v.31, n.4, May, p.431-9. 2011.

Gao, Y., D. D. Mruk, *et al.* Sertoli cells are the target of environmental toxicants in the testis - a mechanistic and therapeutic insight. Expert Opin Ther Targets, Apr 26, p.1-18. 2015.

Gatti, J. L., S. Castella, *et al.* Post-testicular sperm environment and fertility. Anim Reprod Sci, v.82-83, Jul, p.321-39. 2004.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press, New York, NY**, 4:187-191. 2007.

Homma-Takeda, S., Y. Kugenuma, *et al.* Impairment of spermatogenesis in rats by methylmercury: involvement of stage- and cell- specific germ cell apoptosis. Toxicology, v.169, n.1, Dec 1, p.25-35. 2001.

Jassim, A., D. J. Gillott, *et al.* Isolation and biochemical characterization of the human sperm tail fibrous sheath. Hum Reprod, v.7, n.1, Jan, p.86-94. 1992.

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

Kania-Korwel, I. e H. J. Lehmler. Toxicokinetics of chiral polychlorinated biphenyls across different species-a review. Environ Sci Pollut Res Int, Apr 1. 2015.

Klinefelter, G. R., J. E. Welch, *et al.* Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility in vivo and in vitro. J Androl, v.23, n.1, Jan-Feb, p.48-63. 2002.

Li, L. A. Polychlorinated biphenyl exposure and CYP19 gene regulation in testicular and adrenocortical cell lines. Toxicol In Vitro, v.21, n.6, Sep, p.1087-94. 2007.

Mahaffey, K. R., R. P. Clickner, *et al.* Adult women's blood mercury concentrations vary regionally in the United States: association with patterns of fish consumption (NHANES 1999-2004). Environ Health Perspect, v.117, n.1, Jan, p.47-53. 2009.

- Murata, K., P. Grandjean, *et al.* Neurophysiological evidence of methylmercury neurotoxicity. Am J Ind Med, v.50, n.10, Oct, p.765-71. 2007.
- Nordkap, L., E. Carlsen, *et al.* [Male infertility]. Ugeskr Laeger, v.174, n.41, Oct 8, p.2444-8. 2012.
- Pant, N., A. B. Pant, *et al.* Semen quality of environmentally exposed human population: the toxicological consequence. Environ Sci Pollut Res Int, v.20, n.11, Nov, p.8274-81. 2013.
- Petersen, M. S., J. Halling, *et al.* Spermatogenic capacity in fertile men with elevated exposure to polychlorinated biphenyls. Environ Res, v.138, Apr, p.345-51. 2015.
- RIBAROV, S. R., BENOVA, L. C. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. **Biochim Biophys Acta**. 640:721-6, 1981.
- Rison, S.C.G.; Hodgman, T.C.; Thornton, J.M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. *Funct. Integr. Genomics* 2000, 1, 56–69.
- Rodríguez, C. M., Kirby, J. L., and Hinton, B. T. 2002. The development of the epididymis. In *The epididymis—From molecules to clinical practice*, ed. B. Robaire and B. T.Hinton, 251–267. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum.
- Roegge, C. S., V. C. Wang, *et al.* Motor impairment in rats exposed to PCBs and methylmercury during early development. Toxicol Sci, v.77, n.2, Feb, p.315-24. 2004.
- Roegge, C. S. e S. L. Schantz. Motor function following developmental exposure to PCBs and/or MEHG. Neurotoxicol Teratol, v.28, n.2, Mar-Apr, p.260-77. 2006.
- Saez, F., G. Frenette, *et al.* Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. J Androl, v.24, n.2, Mar-Apr, p.149-54. 2003.
- SOKOL, R.Z. The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants. in *Comprehensive Toxicology*. **Reproductive and Endocrine Toxicology**. 10:87–98, 1997.
- STOHS, S. J., BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biol Med**. 18:321–36, 1995.
- Sullivan, R., F. Saez, *et al.* Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. Blood Cells Mol Dis, v.35, n.1, Jul-Aug, p.1-10. 2005.
- Sunderland, E. M. e N. E. Selin. Future trends in environmental mercury concentrations: implications for prevention strategies. Environ Health, v.12, p.2. 2013.
- Tchounwou, P. B., C. Newsome, *et al.* Environmental toxicology and health effects associated with dinitrotoluene exposure. Rev Environ Health, v.18, n.3, Jul-Sep, p.203-29. 2003.
- Thimon V, Calvo E, Koukoui O, *et al.* Effects of vasectomy on gene expression profiling along the human epididymis. *Biol Reprod* 2008; 79:262–273.

Toshimori, K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. Microsc Res Tech, v.61, n.1, May 1, p.1-6. 2003.

Vitalone, A., A. Catalani, *et al.* Long-term effects of developmental exposure to low doses of PCB 126 and methylmercury. Toxicol Lett, v.197, n.1, Aug 1, p.38-45. 2010.

Wang, G., Y. Guo, *et al.* In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. J Proteomics, v.79, Feb 21, p.114-22. 2013.

Wang, S. L., Y. C. Chang, *et al.* Body burdens of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls and their relations to estrogen metabolism in pregnant women. Environ Health Perspect, v.114, n.5, May, p.740-5. 2006.

Widholm, J. J., S. Villareal, *et al.* Spatial alternation deficits following developmental exposure to Aroclor 1254 and/or methylmercury in rats. Toxicol Sci, v.82, n.2, Dec, p.577-89. 2004.

Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG. Physiological volume regulation by spermatozoa. Mol Cell Endocrinol. 2006;250:98–105

Yoshii, T., N. Kuji, *et al.* Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. Mol Hum Reprod, v.11, n.9, Sep, p.677-81. 2005.

Zhao, C., R. Huo, *et al.* Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. Fertil Steril, v.87, n.2, Feb, p.436-8. 2007.

APÊNDICE A

Tabela 4: Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no epidídimo na comparação entre os grupos controle e metilHg(0,05 mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1 mg/Kg/dia).

ID	Nome da Proteína	Score	P	MeHg+Aroclor
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain	320,21	0,98	↑
P62632	Elongation factor 1-alpha 2	1648,43	0,99	↑
P62982	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	191,24	0,96	↑
F1M4G6	Uncharacterized protein (Fragment)	737,14	0,96	↑
B0BMS8	Myl9 protein	1079,22	0,96	↑
F1LP05	ATP synthase subunit alpha	665,2	0,96	↑
P14659	Heat shock-related 70 kDa protein 2	1898,94	0,99	↑
P06761	78 kDa glucose-regulated protein	3328,92	0,99	↑
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	3946,56	0,97	↑
C0JPT7	Filamin alpha	160,9	0,97	↑
P46462	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	439,74	0,97	↑
F8WFK6	Glutathione peroxidase	799,62	0,99	↑
M0R8M9	Heat shock cognate 71 kDa protein	3946,56	0,98	↑
P24090	Alpha-2-HS-glycoprotein	212,56	0,96	↑
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	665,45	0,96	↑
P12346	Serotransferrin	2658,42	0,99	↑
F1LU69	Protein Rps2713	191,24	0,98	↑
P11598	Protein disulfide-isomerase A3	1058,79	0,95	↑
P48500	Triosephosphate isomerase	837,35	0,97	↑

Q5GRG2	Carboxylesterase 5A	615,36	0,97	↑
P31044	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	3999,74	0,99	↑
Q64122	Myosin regulatory light polypeptide 9	1079,22	0,98	↑
M0RCL5	Histone H2A	5157,85	0	↓
P13601	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	1694,46	0	↓
D3ZXP3	Histone H2A	5157,85	0	↓
G3V7C6	RCG45400	4365,52	0,02	↓
P0C170	Histone H2A type 1-E	5157,85	0,01	↓
P0C169	Histone H2A type 1-C	5157,85	0,01	↓
D3ZNZ9	Histone H2B	4497,38	0	↓
P0C0S7	Histone H2A.Z	5157,85	0	↓
P02770	Serum albumin	7360,65	0	↓
Q00729	Histone H2B type 1-A	128,27	0	↓
Q00728	Histone H2A type 4	5157,85	0	↓
Q00715	Histone H2B type 1	4497,38	0	↓
P04905	Glutathione S-transferase Mu 1	5460,98	0,03	↓
P85108	Tubulin beta-2A chain	5165,25	0	↓
M0R BX6	Histone H3	208,58	0	↓
D4A817	Histone H2B	4497,38	0	↓
A0A0A0MXW3	Histone H2A.Z (Fragment)	5157,85	0	↓
M0R BQ5	Histone H2B	4497,38	0	↓
G3V6P6	Putative RNA-binding protein 3	228,51	0,04	↓
D3ZNH4	Histone H2B	4497,38	0	↓

D3ZQN4	Histone H3	208,58	0	↓
B0BN47	Glutathione S-transferase, mu 6	881,69	0,01	↓
Q63862	Myosin-11 (Fragments)	227,56	0,04	↓
P70490	Lactadherin	501,79	0,03	↓
D3ZK97	Histone H3	208,58	0	↓
D4ACV3	Histone H2A	5157,85	0,01	↓
D4A0P4	Histone H3	196,73	0,01	↓
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2 (Fragment)	17495,84	0,02	↓
Q3KRE8	Tubulin beta-2B chain	5165,25	0,01	↓
D3ZWM5	Histone H2B	4497,38	0	↓
G3V9C7	Histone H2B	4497,38	0	↓
G3V9C0	Histone H2A	5157,85	0	↓
D3ZWE0	Histone H2A	3491,01	0	↓
P0CC09	Histone H2A type 2-A	5157,85	0,01	↓
P84245	Histone H3.3	208,58	0	↓
M0R8B6	Protein Tubb1	645,08	0,02	↓
E9PTU4	Myosin-11	300,61	0	↓
P62804	Histone H4	7533,02	0	↓
P69897	Tubulin beta-5 chain	5319,02	0,02	↓
Q4FZT6	Histone H2A type 3	5157,85	0	↓
Q64598	Histone H2A type 1-F	5157,85	0	↓
G3V983	Glutathione S-transferase Mu 1	5460,98	0,02	↓
D3ZCV5	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	1659,74	0	↓
M0R537	Histone H3	208,58	0	↓
Q6LED0	Histone H3.1 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=3	208,58	0	↓

M0RDM4	Histone H2A	5157,85	0	↓
Q6I8Q6	Histone H2A	5157,85	0	↓
B4F7C2	Protein Tubb4a	2973,83	0	↓
M0R4L7	Histone H2B	4497,38	0	↓
P02262	Histone H2A type 1	5157,85	0	↓
D3ZLY9	Histone H2B	4497,38	0	↓
D3ZVK7	Histone H2A	5157,85	0	↓
G3V8B3	Histone H2B	4497,38	0	↓
D3ZJ08	Histone H3	208,58	0	↓
A0A096P6M0	Ornithine decarboxylase antizyme 3 (Fragment)	281,12	0,02	↓

APÊNDICE B

Tabela 5: Proteínas exclusivas no epidídimo na comparação entre os grupos controle e meHg(0,05 mg/Kg/dia) + Aroclor (0,1 mg/Kg/dia).

ID	Nome da Proteína	Score	MeHg + Aroclor
F1LN18	Hypoxia up-regulated protein 1	143,56	-
Q6AYS7	Aminoacylase-1A	85	-
D4A8L8	Protein Fpr2	75,15	-
D4AEE8	Uncharacterized protein	112,1	-
M0R788	Uncharacterized protein	167,21	-
P16638	ATP-citrate synthase	90,41	-
Q6AZ26	C-terminal binding protein 1	139,55	-
Q64428	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	95,3	-
Q9R080	G-protein-signaling modulator 1	156,82	-
D4A5D3	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae) (Predicted)	91,59	-
G3V7P6	Nudix (Nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16 (Predicted), isoform CRA_a	114,96	-
F1LZH9	Protein Ankrd44	95,99	-
D3ZV79	Uncharacterized protein (Fragment)	183,26	-
P63170	Dynein light chain 1, cytoplasmic	291,26	-
P16617	Phosphoglycerate kinase 1	179,27	-
D3ZEV5	Protein Zfp385c	95,88	-
F1MAS0	Protein Krt32	102,89	-
F7F3M3	Protein Ces2a	155,22	-
Q05962	ADP/ATP translocase 1	304,32	-
Q09073	ADP/ATP translocase 2	275,91	-

A0A096 MJ24	Carbonyl reductase [NADPH] 1	182, 62	-
Q6NYB7	Ras-related protein Rab-1A	236, 66	-
M0R3K9	Protein LOC365828 (Fragment)	382, 33	-
G3V7K0	Ceh-10 homeo domain containing homolog (C. elegans), isoform CRA_a	82,3 6	-
Q6QI72	LRRG00136	117, 12	-
P57760	Serine/threonine-protein kinase 16	186, 1	-
G3V7J5	Carboxylesterase 5, isoform CRA_a	88,8 9	-
G3V7J0	Aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1, isoform CRA_b	259, 45	-
D3ZRJ4	Olfactory receptor	288, 14	-
P0C548	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2	91,9 9	-
M0RA31	Protein Enox1	84,5 8	-
D3ZUP1	Protein LOC100365646	154, 43	-
P31977	Ezrin	71,3 2	-
D3ZEP6	Uncharacterized protein	190, 49	-
M0RCH 2	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (Fragment)	307, 33	-
D4A269	Uncharacterized protein	192, 73	-
G3V7H6	Arginase	93,4 1	-
Q63617	Hypoxia up-regulated protein 1	143, 56	-
F1M7Y3	Protein Rap1gds1	104, 23	-
Q08290	Calponin-1	235, 07	-
M0RCF2	Uncharacterized protein	163, 34	-
F1LPK7	Plastin 3 (T-isoform), isoform CRA_a	129, 54	-
Q8SEZ5	Cytochrome c oxidase subunit 2	300, 66	-
P01026	Complement C3	69,5 6	-
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	212, 07	-

F1M513	Protein Rufy4	70,3 4	-
Q63942	GTP-binding protein Rab-3D	236, 66	-
Q66HH8	Annexin	278, 08	-
Q63941	Ras-related protein Rab-3B	296, 38	-
P11442	Clathrin heavy chain 1	93,9 8	-
Q32KK2	Arylsulfatase A OS=Rattus norvegicus GN=Arsa PE=2 SV=1	96,3 2	-
P70580	Membrane-associated progesterone receptor component 1	289, 38	-
Q66HG5	Transmembrane 9 superfamily member 2	102, 25	-
P05714	Ras-related protein Rab-4A	236, 66	-
P20760	Ig gamma-2A chain C region	318, 78	-
Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	113, 29	-
M0RCB8	Uncharacterized protein (Fragment)	533, 83	-
F7FLS6	Leucine zipper putative tumor suppressor 2	92,1 6	-
F1M4M6	Protein Camta1 (Fragment)	78,0 5	-
Q4V8H5	Aspartyl aminopeptidase	173	-
F1MAF7	Protein Krt33b	113, 87	-
P19234	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	161, 02	-
P51156	Ras-related protein Rab-26	236, 66	-
D4ADS8	Ras-related protein Rab-4A	236, 66	-
P70550	Ras-related protein Rab-8B	236, 66	-
Q62812	Myosin-9	85,1 3	-
P51146	Ras-related protein Rab-4B	286, 35	-
D4A4S3	Uncharacterized protein (Fragment)	291, 97	-
R9PXU6	Vinculin	126, 42	-
P43245	Multidrug resistance protein 1	135, 79	-

M0R9K1	Protein Gm7964	74,4 9	-
P50399	Rab GDP dissociation inhibitor beta	149, 84	-
P50398	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	109, 47	-
P52555	Endoplasmic reticulum resident protein 29	265, 25	-
P09117	Fructose-bisphosphate aldolase C	165, 16	-
F1LSG4	Protein Zfp746	87,4 4	-
D4ADN6	Protein Fsd2	155, 4	-
P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	105, 24	-
Q68FU3	Electron transfer flavoprotein subunit beta	123, 7	-
P04906	Glutathione S-transferase P	419, 53	-
Q920L2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	102, 06	-
P62959	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	192, 73	-
P25235	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	101, 32	-
F1LM84	Nidogen-1	74,6 9	-
Q68FR9	Elongation factor 1-delta	160, 82	-
B0BNA5	Coactosin-like protein	643, 58	-
Q68FR6	Elongation factor 1-gamma	218, 61	-
D4A1E8	Protein Lime1	137, 18	-
Q3B7C7	Cell division cycle associated 4	91,3	-
F1LM69	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	137, 94	-
Q5RKJ9	RAB10, member RAS oncogene family	236, 66	-
F7FEZ6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	111, 19	-
Q6AXV8	Protein LOC497899	139, 88	-
D3ZB81	Protein Slc25a31	196, 88	-
P18757	Cystathionine gamma-lyase	107, 22	-

Q8VHF5	Citrate synthase, mitochondrial	179, 29	-
F1LYM2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2 (Fragment)	381, 99	-
Q6IFX1	Keratin, type I cytoskeletal 24	102, 89	-
Q5RKI1	Eukaryotic initiation factor 4A-II	113, 43	-
P62909	40S ribosomal protein S3	412, 18	-
Q6IFW7	Protein Krt28	117, 6	-
Q6IFW6	Keratin, type I cytoskeletal 10	172, 65	-
Q6IFW2	Keratin, type I cytoskeletal 40	102, 89	-
O54858	Carboxypeptidase Z	97,9 7	-
D3ZAU6	Protein RGD1561919	100, 67	-
G3V741	Phosphate carrier protein, mitochondrial	100, 41	-
Q6IFV6	Protein Krt35	102, 89	-
G3V9Y1	Myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle, isoform CRA_b	79,3 9	-
Q6IFV5	Protein Krt36	102, 89	-
Q6IFV4	Keratin, type I cytoskeletal 13	105, 98	-
Q6IFV3	Keratin, type I cytoskeletal 15	74,4 4	-
Q6IFV1	Keratin, type I cytoskeletal 14	84,9 9	-
Q06647	ATP synthase subunit O, mitochondrial	270, 26	-
B6ID09	Fam117a protein	170, 1	-
Q6IFU8	Keratin, type I cytoskeletal 17	88,4 5	-
Q6IFU7	Keratin, type I cytoskeletal 42	145, 4	-
G3V9X2	G-protein signalling modulator 1 (AGS3-like, <i>C. elegans</i>), isoform CRA_c	155, 74	-
M0R684	Protein Ces2a (Fragment)	79,4 2	-
M0R5W3	Uncharacterized protein (Fragment)	196, 88	-
D3ZE95	Protein Zfp385c	82,8 3	-

G3V6P7	Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	69,6	-
Q63598	Plastin-3	129,54	-
P20070	NADH-cytochrome b5 reductase 3	286,83	-
Q6P3V8	Eukaryotic translation initiation factor 4A1	120,49	-
Q01177	Plasminogen	92,75	-
Q6AY07	Fructose-bisphosphate aldolase	116,99	-
Q6PCU3	Aldoc protein OS=Rattus norvegicus GN=Aldoc PE=2 SV=1	165,16	-
B0BMW0	RAB14, member RAS oncogene family	236,66	-
P15429	Beta-enolase	271,95	-
Q02253	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	259,45	-
Q9ERE6	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	119,26	-
D3ZQN6	Protein Stac3	179,52	-
P04256	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa1 PE=1 SV=3	111,19	-
Q4KMA2	UV excision repair protein RAD23 homolog B OS=Rattus norvegicus GN=Rad23b PE=1 SV=1	189,44	-
P14668	Annexin A5	278,08	-
D3ZH98	Uncharacterized protein	79,3	-
M0RBJ7	Complement C3	96,82	-
M0RBJ6	Protein Fgd5 (Fragment)	100,7	-
D3ZE31	Protein Ces2a	79,42	-
Q6MGB1	Protein LOC100911800	326,22	-
M0R618	Protein Etl4 (Fragment)	65,59	-
M0R5P4	Uncharacterized protein (Fragment)	285,54	-
D3ZE29	Uncharacterized protein (Fragment)	212,46	-
P63012	Ras-related protein Rab-3A	236,66	-
P48679	Prelamin-A/C	103,12	-

M0R964	Uncharacterized protein (Fragment)	78,0 4	-
P62271	40S ribosomal protein S18	100, 67	-
G3V6H0	Protein LOC100363782	236, 66	-
Q6P762	Alpha-mannosidase	103, 29	-
D3ZH62	Protein RGD1564730	116, 92	-
F7ETL6	Uncharacterized protein	390, 6	-
Q9WVK7	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	104, 98	-
M0RBF1	Complement C3	96,8 2	-
Q6P9Y4	ADP/ATP translocase 1	292, 83	-
Q3T1L0	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	82,5 9	-
F1M779	Clathrin heavy chain	93,9 8	-
M0R5K9	Protein LOC100912024 (Fragment)	100, 67	-
Q08163	Adenylyl cyclase-associated protein 1	98,5 5	-
G3V9J6	Protein Abcb1b	122, 51	-
F1M6U3	Protein Pitpnm3 (Fragment)	167, 69	-
M0R5J4	Uncharacterized protein	367, 39	-
Q9QZC5	Growth factor receptor-bound protein 7	148, 82	-
Q3T1I4	Protein PRRC1	114, 18	-
P35284	Ras-related protein Rab-12	322, 82	-
P35281	Ras-related protein Rab-10	241, 93	-
P35280	Ras-related protein Rab-8A	236, 66	-
O08701	Arginase-2, mitochondrial	93,4 1	-
M0R5H1	Protein Etl4 (Fragment)	65,5 9	-
Q32Q55	Protein Ces2h	79,4 2	-
F1LXX8	Uncharacterized protein (Fragment)	139, 46	-

G3V9G4	ATP citrate lyase, isoform CRA_b	90,4 1	-
M0R5G1	Uncharacterized protein	82,1 9	-
P05943	Protein S100-A10	190, 49	-
P26284	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	66,3 6	-
G3V9F3	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	119, 26	-
M0R5F7	Protein LOC690400	154, 43	-
P61107	Ras-related protein Rab-14	236, 66	-
F7FED4	Uncharacterized protein	183, 26	-
Q5RJS3	Family with sequence similarity 96, member A	209, 21	-
D3ZZR9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	176, 31	-
F1M9V3	Enolase (Fragment)	133, 02	-
Q5RJR9	Serine (Or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1, isoform CRA_b	105, 48	-
Q6MG61	Chloride intracellular channel protein 1	178, 83	-
F1LRI5	Protein Gcn111	43,8 3	-
P00489	Glycogen phosphorylase, muscle form	83,4 6	-
P62890	60S ribosomal protein L30	217, 27	-
M0R8J8	Protein LOC100910259	79,4 2	-
P02650	Apolipoprotein E	180, 74	-
Q9EQS4	Cystathionase (Cystathionine gamma-lyase)	107, 22	-
P10536	Ras-related protein Rab-1B	236, 66	-
D3ZZN3	Acetyl-coenzyme A synthetase	97,0 3	-
D4A0G7	Protein LOC100364984	236, 66	-
Q9EQP5	Prolargin	133, 04	-
F1LUK2	Uncharacterized protein (Fragment)	141, 41	-
M0R8F9	Protein Gm17555 (Fragment)	183,	-

		26	
M0RAX9	Protein Npnt	99,3 2	-
P10868	Guanidinoacetate N-methyltransferase	135, 82	-
Q641Y0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	137, 94	-
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	986, 68	-
F7FKI5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	66,3 6	-
P62839	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	381, 99	-
Q9JLT0	Myosin-10	81,6 6	-
Q5XIV1	Phosphoglycerate kinase	235, 97	-
M0R8D4	Protein Npnt	99,3 2	-
P07150	Annexin A1	116, 68	-
P62824	Ras-related protein Rab-3C	236, 66	-
F1M6H0	Protein Etl4 (Fragment)	68,7	-
E9PU76	Protein LOC100364078	139, 46	-
D3ZJJ9	Protein LOC100911814	216, 67	-
M0RAU4	Uncharacterized protein (Fragment)	367, 39	-
Q63180	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7	116, 19	-
Q794E4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	124, 1	-
P00406	Cytochrome c oxidase subunit 2	300, 66	-
P24368	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	271, 18	-
O88767	Protein DJ-1	441, 08	-
M0RAQ7	Uncharacterized protein	121, 04	-
M0R584	Uncharacterized protein (Fragment)	111, 19	-
Q9Z2F5	C-terminal-binding protein 1	139, 55	-
G3V8V3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	83,4 6	-
G3V8V1	Granulin, isoform CRA_c	107,	-

		9	
M0R4V7	Protein Npnt	99,5 5	-
M0R4V4	Protein Slc25a23	165, 22	-
E9PU16	Ras-related protein Rab-1A	236, 66	-
P07448	Dentinal fluid transport-stimulating peptide	714, 74	-
G3V960	Guanidinoacetate N-methyltransferase	135, 82	-
M0R4U4	Triosephosphate isomerase (Fragment)	499	-
D3ZCV0	Protein Actn2	125, 07	-
P32551	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	107, 14	-
P04166	Cytochrome b5 type B	435, 93	-
P85972	Vinculin	136, 68	-
Q07936	Annexin A2	183, 49	-
E9PTM0	Protein Eddm3b	85,8 6	-
G3V936	Citrate synthase	177, 11	-
M0RAJ0	Uncharacterized protein (Fragment)	183, 26	-
F1M9B1	Protein LOC100912008 (Fragment)	100, 65	-
M0RAI9	Protein Nelfcd (Fragment)	245, 22	-
D3ZSP1	Protein LOC100361838	449, 1	-
Q925G0	Putative RNA-binding protein 3	118, 49	-
P23514	Coatomer subunit beta	135, 76	-
D3ZD09	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	847, 56	-
Q5PQQ7	LIX1-like protein	302, 45	-
P61078	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	381, 99	-
P05545	Serine protease inhibitor A3K	118, 59	-
D3ZVS4	Uncharacterized protein (Fragment)	173, 84	-
Q5D059	Hnrpk protein	90,4	-

		2	
G3V8L3	Lamin A, isoform CRA_b	99,3	-
M0RAE7	Uncharacterized protein	83,4 6	-
M0RAE2	Uncharacterized protein	183, 26	-
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha	550, 67	-
B4F7A5	Cd99 protein	147, 42	-
E9PTD9	Toll-like receptor	66,5 9	-
D4A376	Ras-related protein Rab-12	322, 82	-
D3ZCJ0	Protein Pitpnm3	167, 69	-
D3ZYU0	Enolase	228, 82	-
P29457	Serpin H1	82	-
P04764	Alpha-enolase	367, 39	-
M0R4G0	Protein LOC100910729	90,1 7	-
B5DEY0	Pls1 protein	232, 62	-
D4ABQ0	Protein LOC100362916	85,8 6	-
D3ZIQ1	Protein Acot4	101, 52	-
P47727	Carbonyl reductase [NADPH] 1	417, 87	-
F1LZZ2	Uncharacterized protein	208, 66	-
F1M5M8	Protein LOC100364984	236, 66	-
B5DF65	Biliverdin reductase B (Flavin reductase (NADPH))	410, 4	-
D3ZVH2	Protein RGD1560831	106, 33	-
Q5U2X0	CDKN2A-interacting protein	85,7 7	-
Q3LUD4	Leucine zipper putative tumor suppressor 2	92,1 6	-
A0A096 MJE0	Protein Krt32 (Fragment)	102, 89	-
D4A641	Protein LOC690386	154, 43	-
Q5XHX8	Testicular haploid expressed gene protein	104,	-

		16	
D3ZM33	Protein LOC100362298 (Fragment)	100,67	-
D4A5Q9	Glycine decarboxylase (Predicted), isoform CRA_a	326,47	-
F1LQC3	Collagen alpha-1(XII) chain (Fragment)	184,66	-
Q6V7V2	Rhotekin	87,12	-
P16036	Phosphate carrier protein, mitochondrial	94,81	-
P17475	Alpha-1-antitrypsin	92,76	-
Q3MIE4	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	136,05	-
O35264	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	169,23	-
F7FPR9	Protein LOC100361783	139,46	-
P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	90,42	-
F1M5F6	Uncharacterized protein (Fragment)	113,18	-
D3ZBZ9	Protein Ttc33	143,75	-
Q5U316	Ras-related protein Rab-35	236,66	-
M0R3X6	Carbonyl reductase [NADPH] 1	417,87	-
P05197	Elongation factor 2	242,09	-
P13084	Nucleophosmin	350,23	-
B2RZ72	Actin related protein 2/3 complex, subunit 4 (Predicted), isoform CRA_a	197,23	-
D3ZS97	CD226 antigen (Predicted), isoform CRA_b	116,1	-
G3V888	ATP citrate lyase, isoform CRA_a	90,41	-
F1M5C9	Uncharacterized protein (Fragment)	381,99	-
P51886	Lumican	125,97	-
Q5U300	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	91,85	-
D3Z9F8	Collagen alpha-1(XII) chain	105,15	-
M0RD73	Uncharacterized protein	183,26	-
M0RCV2	Protein LOC100363436	297,	-

		11	
F1LN61	Uncharacterized protein	318,78	-
F6SF42	Protein Krt33b	113,87	-
B2RZ57	Mitochondrial ribosomal protein L18	160,54	-
G3V7U4	Lamin-B1	127,32	-
P14141	Carbonic anhydrase 3	339,49	-
G3V7T7	A disintegrin and metalloprotease domain 7, isoform CRA_a	116,19	-
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	125,1	-
D4AEG9	Protein Hesx1	111,2	-
P16303	Carboxylesterase 1D	79,42	-
Q6AYT7	Monoacylglycerol lipase ABHD12	105,87	-
P07323	Gamma-enolase	251,58	-
P35704	Peroxiredoxin-2	202,57	-
D4A5G8	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	66,36	-
D4A8M5	Protein Snrpep2	449,1	-
Q53B90	Ras-related protein Rab-43	236,66	-
M0R449	Uncharacterized protein (Fragment)	183,26	-
M0R6Y8	Phosphoglycerate kinase	116,92	-
G3V834	Protein PRRC1	114,18	-
P81155	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	94,35	-
D3ZRP2	Olfactory receptor	65,43	-
F1LQ56	Protein Fgd1	79,21	-
M0R6U4	Uncharacterized protein (Fragment)	88,12	-
Q6PTT0	Aminoacylase-1B	85	-
B2RYL1	Chromosome transmission fidelity protein 8 homolog isoform 2	68,41	-
Q6TUG0	DnaJ homolog subfamily B member 11	79,3	-

		1	
P63142	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 2	78,9	-
		1	
Q9JKC9	Synergin gamma	48,3	-
		1	
D4AB94	Uncharacterized protein	48,3	-
		1	
B2RYJ7	ARP1 actin-related protein 1 homolog B (Yeast)	84,9	-
		5	
F1MAP0	Uncharacterized protein	94,3	-
		4	
A0A096	Protein Stard8	82,7	-
MJ12		9	
F1M574	Protein Spata17 (Fragment)	106,	-
		94	
F1LT71	Echinoderm microtubule associated protein like 4 (Predicted), isoform CRA_a	73,8	-
		2	
F1LZC5	Protein Ndufa13 (Fragment)	122,	-
		91	
M0R6Q4	Uncharacterized protein	79,2	-
		1	
Q5VLR5	BWK4	104,	-
		88	
P55213	Caspase-3	93,8	-
		5	
D3ZXT8	Protein Tgfbrap1	73,9	-
		4	
Q62875	Allergin-1	100,	-
		46	
Q7TP19	Cb1-812	90,9	-
		4	
Q711G3	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	118,	-
		84	
D3ZHS6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1	77,1	-
		3	
Q9Z0T0	Thiopurine S-methyltransferase	90,9	-
		4	
F1LPI8	Tyrosine-protein kinase Fer	71,2	-
		2	
M0RCC0	Protein Zfp106	57,3	-
D3ZY17	Protein Rps6ka5	101,	-
		42	
D4AE69	Protein Tmem51	97,4	-
		5	
F6T9E7	Protein Selp1g	95,4	-
		6	
D3ZY08	Protein RGD1559578	76,3	-
		9	
Q5FVR5	Acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 2	76,3	-

		2	
Q5FVP8	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	85,0	-
		2	
D4A4R7	Protein Serpina1f	81,8	-
		5	
P02767	Transthyretin	213,	-
		14	
Q68FX5	snRNA-activating protein complex subunit 2	83,1	-
		3	
D3ZEE8	Protein LOC691418	90,5	-
		7	
F1M4H7	Protein Smek3	78,5	-
		1	
Q68FV4	Uncharacterized protein C17orf74 homolog	99,9	-
O35162	Heat shock 70 kDa protein 13	76,2	-
		7	
G3V6Y6	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	78,6	-
		4	
D4ADL5	Protein Adat1	69,8	-
		5	
F1LZ24	Protein argonaute (Fragment)	131,	-
		45	
A0A0A0 MXZ5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1	77,1	-
		3	
G3V796	Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	67,7	-
		5	
D3ZAY5	Uncharacterized protein (Fragment)	128,	-
		02	
Q68FR7	Protein LTV1 homolog	102,	-
		33	
P52873	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	87,6	-
		8	
D3ZQX2	Protein Lilrb3	75,1	-
		9	
F1M4C6	Protein LOC690568 (Fragment)	77,3	-
		8	
D4A1D8	Protein Surf4	72,0	-
		2	
F1LVH3	Protein Lrit3	73,4	-
		5	
P51400	Double-stranded RNA-specific editase 1	67,8	-
		3	
F1LSA0	Nuclear receptor corepressor 1	79,1	-
		2	
F7FLF2	Protein LOC100360057 (Fragment)	132,	-
		08	
G3V6T1	Coatomer subunit alpha	74,1	-
		7	
P09760	Tyrosine-protein kinase Fer	76,7	-

		6	
G3V6S1	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	107,76	-
F1MA89	Protein Ccny	116,07	-
Q6P7A7	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	73,68	-
Q6IFV0	Protein Ka11	72,81	-
M0RBR2	Protein Ago3 (Fragment)	118,44	-
B0BMZ5	LOC687696 protein	76,11	-
P30152	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	109,12	-
D4A4E7	Protein Tmco2	103,38	-
A0A0A0MY44	Butyrophilin-like protein 2	115,75	-
B1WBY5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 11	91,38	-
F1LVB0	Protein LOC100912642 (Fragment)	67,1	-
Q4L1J4	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	117,47	-
Q4KMC4	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2	80,97	-
D3ZTT1	Protein Medag	79,99	-
Q63560	Microtubule-associated protein 6	93,68	-
F1LS83	Nuclear receptor corepressor 1	68,61	-
F1LS82	Nuclear receptor corepressor 1	79,12	-
D3Z7Z1	Olfactory receptor	72,12	-
P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	93,92	-
M0R631	Protein RGD1563334 (Fragment)	82,78	-
D3ZWX4	NCK interacting protein with SH3 domain (Predicted), isoform CRA_a	89,59	-
G3V9Q3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	87,89	-
M0R972	Uncharacterized protein	113	-
Q99PD6	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	142,66	-
Q1KZH8	Placental lactogen I alpha	78,2	-

		8	
D3ZX77	Bat4	86,8	-
		6	
D3ZX74	Coenzyme Q10 homolog A (Yeast) (Predicted), isoform CRA_b	86,7	-
		3	
D3ZTP0	Protein Aldh1l2	77,2	-
		5	
F1M451	Uncharacterized protein	82,2	-
		1	
M0R8U7	Protein Spata17 (Fragment)	117,	-
		94	
D3ZE15	Protein LOC100911483	122,	-
		91	
D3ZQI4	Protein Zfand1	76,0	-
		1	
F1LUW3	Uncharacterized protein (Fragment)	182,	-
		53	
D3ZAG6	Protein Lix1	99,7	-
		2	
P46101	Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6	78,6	-
		3	
F1LUV3	Protein LOC291543 (Fragment)	75,9	-
		8	
F1LUV0	Uncharacterized protein (Fragment)	93,6	-
		4	
P14604	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	107,	-
		02	
D4AA20	Protein Zfp697	105,	-
		14	
D3ZWQ7	Glutathione peroxidase	89,8	-
		1	
F7ETI3	Protein Wdr41	66,4	-
		9	
D4A0P5	Protein Wdr41	89,0	-
		1	
F1M6T7	Protein Erich5 (Fragment)	122,	-
		84	
Q32ZH2	Beta-defensin 20	91,1	-
		7	
F1LUS2	Protein argonaute (Fragment)	123,	-
		18	
Q99M64	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	70,2	-
		7	
P02696	Retinol-binding protein 1	112,	-
		87	
Q6MG97	Butyrophilin-like protein 2	115,	-
		75	
P30710	Epididymal secretory glutathione peroxidase	89,8	-
		1	
D3ZZT9	Protein Col14a1	79,0	-

		6	
D3ZAB7	Protein LOC102554302	105,16	-
P46413	Glutathione synthetase	90,14	-
F1LUQ5	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 4 (Predicted)	76,37	-
F1LV13	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	64,29	-
D3ZGL7	Protein Col10a1	73,34	-
P21702	Prolactin-3D1	78,28	-
A0A096MKG2	Protein Nol6	72,48	-
D3ZN70	Nuclear receptor corepressor 1	68,61	-
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	79,58	-
P53534	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	78,64	-
Q4V7B0	Uncharacterized protein C9orf117 homolog	84,03	-
P97615	Thioredoxin, mitochondrial	217,14	-
Q5RJN9	Uncharacterized protein C14orf79 homolog	75,99	-
M0R8G3	Uncharacterized protein	84,58	-
Q4KLN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF8	68,86	-
D4A9Y0	Protein Sdf2l1	85,25	-
Q641Y7	8-oxo-dGDP phosphatase NUDT18	74,52	-
F1M3D3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	64,29	-
Q9Z2M4	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	73,76	-
P07153	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	73,68	-
G3V678	Protein LOC100912534	84,26	-
P70712	Kynureninase	70,48	-
D4A6N8	Protein Tbr1	80,45	-
E9PTT8	Cysteine-rich secretory protein 1	118,58	-
G3V649	Double-stranded RNA-specific editase 1	67,8	-

		3	
P01830	Thy-1 membrane glycoprotein	81,1 9	-
D3ZCZ3	Protein Cys1	190, 16	-
D3ZA50	Protein Klhl15	167, 36	-
F7F1Q9	Protein Vom1r65	102, 61	-
Q4V797	Interferon-gamma-inducible GTPase Ifgga1 protein	105, 74	-
Q5HZE8	Transmembrane protein 59-like	66,9 7	-
D4A6J0	IQ calmodulin-binding motif containing 1 (Predicted), isoform CRA_a	79,7 9	-
P47198	60S ribosomal protein L22	169, 75	-
D3ZSV9	Pleckstrin homology domain containing, family A member 5, isoform CRA_c	72,2 2	-
F1LQZ9	Microtubule-associated protein 6	72,7 2	-
A4KWA8	C-type lectin domain family 2 member D6	85,8 2	-
B5DFI7	Glutaminyl-peptide cyclotransferase-like	90,5 7	-
D3ZD56	Ferritin	69,9 2	-
P08503	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	67,7 5	-
A0A096MJW7	Protein Smek3	70,9 3	-
Q4QR72	Protein MGC114529	90,3 7	-
M0RAF1	Protein Aldh1l2 (Fragment)	77,2 5	-
D3ZMA1	Protein Hoxb5	73,8 5	-
D4A9F7	Protein Serpine3	96,0 8	-
D3ZG37	Protein Ppp6r1	71,1 7	-
A0A096MK07	Uncharacterized protein	60,5 6	-
D3ZYW2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	87,8 9	-
D3ZCK4	Protein Def6	69,9 9	-
D4A9C5	Uncharacterized protein	73,2 4	-
Q02765	Cathepsin S	94,3	-

		3	
Q9JHY1	Junctional adhesion molecule A	88,8	-
		3	
D4A007	Protein Smek3	83,9	-
		5	
Q62627	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	160,	-
		84	
A0A096	Phosphoglycerate kinase 1 (Fragment)	97,6	-
MJL6			
M0R7L5	Protein LOC100912008 (Fragment)	72,0	-
		2	
D3ZLY5	Protein RGD1564171	138,	-
		72	
D4AC20	Cytidine deaminase (Predicted)	104,	-
		59	
D3ZM91	Protein Sync	73,2	-
		3	
D4AC15	Protein Tectb	84,5	-
Q6XFR6	Glycophorin-C	148,	-
		43	
D3ZZ13	Protein Sox12	93,8	-
		3	
Q5U2X8	Acyl-CoA thioesterase 9	87,5	-
		8	
Q497B0	Omega-amidase NIT2	99,7	-
D3ZYM3	Protein Enox1	93,9	-
Q71UE8	NEDD8	97,7	-
		4	
M0RA88	Protein Aldh1l2 (Fragment)	77,2	-
		5	
B2GV82	Nle1 protein	65,5	-
		3	
F1LQB3	Protein LOC100912634	78,2	-
		8	
D4ABI6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	127,	+
		74	
F1M5H1	Uncharacterized protein (Fragment)	94,4	+
		9	
F1LTG8	Protein Tcf15 (Fragment)	45,6	+
		6	
M0R7B3	Protein Morn3	123,	+
		07	
F1LN62	Gephyrin (Fragment)	61,3	+
		1	
F1M8H2	Protein Wars2	84,4	+
M0R471	Protein Morn3	106,	+

		86	
M0RA08	Perilipin	55,6 9	+
M0RA00	Uncharacterized protein (Fragment)	58,9 3	+
F1LN41	Mitogen-activated protein kinase 4	92,0 9	+
E9PSN4	Protein Zc3h13	74,5 4	+
Q91Z79	Liprin-alpha-3	34,4 1	+
P23785	Granulins	107, 9	+
Q7TP79	Aa2-245	71,1 3	+
Q7TP10	Cc2-36	65,9	+
D3Z8R4	Protein Rbm2511	229, 97	+
Q5FVQ6	Interferon-gamma-inducible GTPase Ifgga3 protein	67,3 5	+
D3ZKR3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	52,0 8	+
F1M4D1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	52,0 8	+
O70351	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	153, 05	+
D4A7P5	Protein Pcdhb20	42,3 5	+
G3V6S7	Interleukin 5 receptor, alpha	44,8 2	+
B0BMW2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	153, 05	+
P52164	Protein max	129, 28	+
O55232	Orexin	93,2 7	+
G3V9D8	Protein Ces2c	485, 67	+
Q6MG75	Protein Nelfe	173, 2	+
D4ACN4	Protein Zfp609	47,4 9	+
Q4FZX7	Signal recognition particle receptor subunit beta	100, 72	+
F1LUI2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	52,0 8	+
Q71RJ2	Voltage-dependent calcium channel gamma-2 subunit	151, 85	+
F1LTU2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	50,4	+

F1M5A1	Protein Calr4 (Fragment)	47,1 5	+
D3ZJ56	Protein LOC685116	88,6 8	+
D3ZXU3	Protein Ceacam18	96,1 3	+
Q6QI43	LRRGT00165	69,2 4	+
D3ZWC6	Protein Sntb1	107, 92	+
D3ZPR0	Chromosome segregation 1-like (<i>S. cerevisiae</i>) (Predicted)	47,1 3	+
O88751	Calcium-binding protein 1	154, 11	+
O54767	Zona pellucida sperm-binding protein 2	88,5 8	+
M0RAS6	Protein LOC100910979	63,9 8	+
M0RB30	Olfactory receptor	121, 89	+
O08561	Phosphatidylinositol 4-kinase beta	67,1 7	+
M0R9Z3	Uncharacterized protein (Fragment)	58,9 3	+
G3V798	Protein Srsf4	59,1	+
D4A7R5	Protein Ovch2	77,8 3	+
M0R423	Gephyrin (Fragment)	61,3 1	+
F1MAT0	Protein Vom2r52	63,1 9	+
D4A8F0	Protein Zbtb49	75,4 6	+
M0R742	Uncharacterized protein (Fragment)	58,9 3	+
Q6QI82	LRRGT00126	74,9 1	+
Q78P75	Dynein light chain 2, cytoplasmic	291, 26	+
E9PTZ5	Protein Pcdha5	66,2 3	+
Q9Z1T4	Connector enhancer of kinase suppressor of ras 2	42,1 9	+
M0R4S4	Zona pellucida glycoprotein 2, isoform CRA_b	88,5 8	+
E9PU28	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	52,8 9	+
D4A7P2	Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 2	34,7 5	+

G3V771	Endothelin 2	40,5 9	+
F1MAM6	Protein Dnah8	18,7 2	+
M0R9U7	Uncharacterized protein (Fragment)	58,9 3	+
Q8CIR5	Menage a trois 1	34,6	+
D4A7Z0	Protein Wdtd1	64,7 4	+
P19223	Carboxypeptidase B	72,5 2	+
D3ZYM6	Protein Calr4	56,8	+
F1MA86	Gephyrin (Fragment)	61,3 1	+
D3ZB58	Protein Ifnlr1	59,9 2	+
B2RYE1	Peli1 protein	74,4 2	+
D4A224	Protein RGD1310016	65,6 9	+
D4A2K1	Protein Hoga1	162, 25	+
D3ZHK5	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	42,8 3	+
G8JLS4	Optineurin	32,4 6	+
D4A3W6	Dual specificity phosphatase 16 (Predicted)	58,0 1	+
G3V9J9	Mitogen-activated protein kinase 4	92,0 9	+
G3V6D0	Alpha-fetoprotein	36,4 8	+
D4AB01	Histidine triad nucleotide binding protein 2 (Predicted), isoform CRA_a	110, 35	+
D3ZE91	Potassium channel tetramerisation domain containing 9 (Predicted), isoform CRA_b	62,9 9	+
Q80ZA3	Alpha-2 antiplasmin	56,9 4	+
P02773	Alpha-fetoprotein	36,4 8	+
F1LSJ2	Uncharacterized protein (Fragment)	88,2 6	+
D4A1I0	Protein RGD1307100	41,4 5	+
P10960	Sulfated glycoprotein 1	52,3	+
D4A1D9	Protein Six6os1	38,1 1	+

Q9QZH4	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2	35,4 8	+
Q63515	C4b-binding protein beta chain	107, 87	+
M0RBG5	Uncharacterized protein	69,2 4	+
D3ZNB8	Protein RGD1310016	70,2 5	+
M0RBG4	Protein Ppm 1m	47,9 2	+
M0RC63	Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 2 (Fragment)	34,7 5	+
P28818	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	42,8 3	+
M0RDS2	Uncharacterized protein (Fragment)	58,9 3	+
Q5XIL4	Protein Sorbs3	64,6 3	+
Q66H94	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	57,7 1	+
F1LM43	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	42,8 3	+
F1LM43	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	42,8 3	+
D4A6Y6	Protein Slc25a26 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a26 PE=3 SV=1	119, 8	+
Q6AXT0	39S ribosomal protein L37, mitochondrial	95,3 2	+
Q91Y78	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	127, 74	+
P63083	Protein S100-A5	61,3 5	+
P23943	Endothelin-2	40,5 9	+
P70483	Striatin	50,7 4	+
Q4KM47	Cyclin-dependent kinase 10	88,5	+
P68182	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	40,6 7	+
P26255	Beta-3 adrenergic receptor	82,0 2	+
Q4V7C0	DSN1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	105, 17	+
Q6MG49	Large proline-rich protein BAG6	61,0 9	+
Q4FZV3	Axonemal dynein light intermediate polypeptide 1	90,1	+
E9PTT9	Uncharacterized protein (Fragment)	58,9 3	+

P84551	SKI family transcriptional corepressor 1	76,8 1	+
P98087	Cerebellin-2	73,5 4	+
Q6IRK9	Carboxypeptidase Q	62,1 4	+
Q63454	Mitogen-activated protein kinase 4 (Fragment)	92,0 9	+
M0RDQ0	Uncharacterized protein	60,1 9	+
Q03555	Gephyrin	72,2 5	+
D3ZSM0	Uncharacterized protein	33,7 7	+
F7EPE0	Sulfated glycoprotein 1	52,3	+
M0R7R6	Uncharacterized protein (Fragment)	58,9 3	+
M0R7Q8	Protein Ppm1m	47,9 2	+
D3ZVP6	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1 (Predicted)	38,8 8	+
Q5PQK1	Septin-10	43,0 3	+
P0CAX5	Oligophrenin-1	54,9 5	+
O70188	Nuclear factor 1	96,5 3	+
Q5U2X2	Sperm-associated antigen 1	71,8 1	+
Q5XI93	Protein Ttc4	56,3 1	+

APÊNDICE C

Tabela 6: Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no epidídimo na comparação entre os grupos controle e meHg(0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1 mg/Kg/dia).

ID	Nome da proteína	Score	P	MeHg+Aroclor
Q6AZ25	Tropomyosin1, alpha	397,8	0,97	↑
M0R757	Elongationfactor 1-alpha	1763,21	0,98	↑
F1LML2	Polyubiquitin-B	191,24	0,99	↑
P04692	Tropomyosin alpha-1 chain	661,81	0,99	↑
Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain	185,7	0,99	↑
D3ZXS6	Elongationfactor 1-alpha	1761,16	0,97	↑
P62982	Ubiquitin-40S ribosomalprotein S27a	191,24	0,96	↑
F1LM19	Alpha-2-HS-glycoprotein	212,56	0,97	↑
B0BMS8	Myl9 protein	1079,22	0,96	↑
Q91XN6	Tropomyosin1, alpha, isoformCRA_h	661,81	0,98	↑
F1M786	Carboxylesterase 5A	615,36	0,98	↑
V9GZ85	Actin, cytoplasmic2 (Fragment)	17495,84	0,99	↑
P24090	Alpha-2-HS-glycoprotein	212,56	0,97	↑
M0RAS8	Elongationfactor 1-alpha (Fragment)	1761,16	0,99	↑
Q63429	Polyubiquitin-C	191,24	0,98	↑
P63259	Actin, cytoplasmic 2	17495,84	0,95	↑
Q5XIF6	Tubulin alpha-4A chain	194,14	0,97	↑
F1LU69	Protein Rps2713	191,24	0,99	↑
F7FK40	Tropomyosin1, alpha, isoformCRA_c	397,8	0,99	↑
Q5GRG2	Carboxylesterase 5A	615,36	0,98	↑

D4A5P1	Uncharacterizedprotein (Fragment)	1350,54	0,98	↑
D3ZVB7	Osteoglycin (Predicted)	189,79	0,98	↑
Q64122	Myosin regulatory light polypeptide 9	1079,22	0,97	↑
D4AEC0	Histone H2A	5157,85	0	↓
F7F3M3	Protein Ces2a	155,22	0	↓
M0RCL5	Histone H2A	5157,85	0	↓
G3V7J5	Carboxylesterase5, isoformCRA_a	88,89	0,04	↓
D3ZXQ0	Protein Ces2g	88,89	0,05	↓
P02454	Collagen alpha-1(I) chain	342,23	0,03	↓
P13601	Aldehydedehydrogenase, cytosolic1	1694,46	0	↓
D3ZXP3	Histone H2A	5157,85	0	↓
G3V7C6	RCG45400	4365,52	0,01	↓
P0C170	Histone H2A type 1-E	5157,85	0	↓
P0C169	Histone H2A type 1-C	5157,85	0	↓
Q66HD0	Endoplasmin	1600,45	0,01	↓
D3ZNZ9	Histone H2B	4497,38	0,01	↓
P0C0S7	HistoneH2A.Z	5157,85	0	↓
Q00729	Histone H2B type 1-A	128,27	0,01	↓
Q00728	Histone H2A type4	5157,85	0	↓
Q00715	Histone H2B type1	4497,38	0,01	↓
P04905	Glutathione S- transferase Mu 1	5460,98	0,04	↓
P85108	Tubulin beta-2A chain	5165,25	0,02	↓

M0RBX6	Histone H3	208,58	0	↓
D4A817	Histone H2B	4497,38	0,02	↓
A0A0A0MXW3	HistoneH2A.Z (Fragment)	5157,85	0	↓
P00502	Glutathione S- transferase alpha-1	968,08	0,05	↓
M0RBQ5	Histone H2B	4497,38	0,01	↓
M0R684	Protein Ces2a (Fragment)	79,42	0,04	↓
Q6P3V8	Eukaryotic translation initiation factor 4A1	120,49	0	↓
D3ZE63	Protein LOC679748	2875,24	0	↓
D3ZNH4	Histone H2B	4497,38	0	↓
D3ZGY4	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	1426,89	0,04	↓
D3ZE31	Protein Ces2a PE=3 SV=2	79,42	0,05	↓
P06761	78 kDa glucose- regulatedprotein	3328,92	0	↓
F7F2H5	Glutathione S- transferase (Fragment)	968,08	0,03	↓
B1WBQ8	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	755,99	0	↓
G3V6D3	ATP synthasubunit beta	1302,62	0	↓
D4ACV3	Histone H2A	5157,85	0	↓
Q3KRE8	Tubulin beta-2B chain	5165,25	0,02	↓
D3ZWM5	Histone H2B	4497,38	0	↓
G3V9D8	Protein Ces2c	485,67	0	↓
M0R8J8	Protein LOC100910259	79,42	0,04	↓

G3V9C7	Histone H2B	4497,38	0	↓
G3V9C0	Histone H2A	5157,85	0,01	↓
D3ZWE0	Histone H2A	3491,01	0	↓
P0CC09	Histone H2A type 2-A	5157,85	0	↓
P84245	HistoneH3.3	208,58	0	↓
M0R8B6	Protein Tubb1	645,08	0	↓
P62804	Histone H4	7533,02	0	↓
P69897	Tubulin beta-5 chain	5319,02	0,01	↓
Q4FZT6	Histone H2A type3	5157,85	0	↓
P51647	Retinaldehydrogenase1	3311,97	0,01	↓
M0R590	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1426,89	0,03	↓
Q64598	Histone H2A type 1-F	5157,85	0,01	↓
G3V983	Glutathione S-transferase Mu 1	5460,98	0,02	↓
D3ZCV5	Aldehydedehydrogenase, cytosolic1	1659,74	0	↓
P09606	Glutaminesynthetase	4294,7	0,04	↓
F1M9F0	Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2 (Fragment)	241,88	0,05	↓
M0RDM4	Histone H2A	5157,85	0	↓
B4F7C2	Protein Tubb4a	2973,83	0	↓
M0R4L7	Histone H2B	4497,38	0,02	↓
Q62669	Protein Hbb-b1	101,05	0,05	↓

P02262	Histone H2A type1	5157,85	0	↓
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1426,89	0,05	↓
D3ZLY9	Histone H2B	4497,38	0,02	↓
O70177	Carboxylesterase	132,28	0	↓
D3ZVK7	Histone H2A	5157,85	0	↓
G3V8B3	Histone H2B	4497,38	0,01	↓
P30904	Macrophage migration inhibitory factor	2875,24	0	↓
Q9ESV6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	755,99	0,02	↓
F1LQC3	Collagen alpha-1(XII) chain (Fragment)	184,66	0,02	↓
Q63081	Proteindisulfide-isomerase A6	1267,1	0,03	↓
O35244	Peroxiredoxin-6	3592,94	0,04	↓
D3Z9F8	Collagen alpha-1(XII) chain	105,15	0	↓
A9UMV8	HistoneH2A.J	5157,85	0	↓
D3ZP14	Protein Ces2j	192,39	0	↓
Q9Z1B2	Glutathione S-transferase Mu 5	673,17	0,03	↓

APÊNDICE D

Tabela 7: Proteínas exclusivas no epidídimo na comparação entre os grupos controle e meHg(0,5 mg/Kg/dia) + Aroclor (1,0 mg/Kg/dia).

ID	Nome da Proteína	Score	Grupo MeHg + Aroclor
F1LN18	Hypoxia up-regulated protein 1	143,56	-
D4A5D3	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (Predicted)	91,59	-
F1LMP7	Granulins	107,9	-
M0R788	Uncharacterized protein	167,21	-
Q9R080	G-protein-signaling modulator 1	156,82	-
P16638	ATP-citrate synthase	90,41	-
Q6AZ26	C-terminal binding protein 1	139,55	-
Q64428	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	95,3	-
G3V7P6	Nudix (Nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16 (Predicted), isoform CRA_a	114,96	-
F1LZH9	Protein Ankrd44	95,99	-
D3ZV79	Uncharacterized protein (Fragment)	183,26	-
D3ZRP2	Olfactory receptor	65,43	-
F1LQ56	Protein Fgd1	79,21	-
P23785	Granulins	107,9	-
M0R6U4	Uncharacterized protein (Fragment)	88,12	-
D3ZEV5	Protein Zfp385c OS=Rattus norvegicus GN=Zfp385c PE=4 SV=1	95,88	-
F1MAS0	Protein Krt32	102,89	-
Q6PTT0	Aminoacylase-1B	85	-
B2RYL1	Chromosome transmission fidelity protein 8 homolog isoform 2	68,41	-
Q05962	ADP/ATP translocase 1	304,32	-
Q09073	ADP/ATP translocase 2	275,91	-

A0A096MJ24	Carbonyl reductase [NADPH] 1	182,62	-
Q6TUG0	DnaJ homolog subfamily B member 11	79,31	-
P63142	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 2	78,91	-
Q6NYB7	Ras-related protein Rab-1A	236,66	-
Q9JKC9	Synerglin gamma	48,31	-
D4AB94	Uncharacterized protein	48,31	-
B2RYJ7	ARP1 actin-related protein 1 homolog B (Yeast)	84,95	-
F1MAP0	Uncharacterized protein	94,34	-
A0A096MJ12	Protein Stard8	82,79	-
F1M574	Protein Spata17 (Fragment)	106,94	-
P81155	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	94,35	-
D4AEE8	Uncharacterized protein	112,1	-
G3V7K0	Ceh-10 homeo domain containing homolog (C. elegans), isoform CRA_a	82,36	-
F1LT71	Echinoderm microtubule associated protein like 4 (Predicted), isoform CRA_a	73,82	-
F1LZC5	Protein Ndufa13 (Fragment)	122,91	-
Q6QI72	LRRG00136	117,12	-
M0R6Q4	Uncharacterized protein	79,21	-
Q6AYK3	Inositol-3-phosphate synthase 1	125,44	-
P57760	Serine/threonine-protein kinase 16	186,1	-
Q5VLR5	BWK4	104,88	-
G3V7J0	Aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1, isoform CRA_b	259,45	-
D3ZRJ4	Olfactory receptor	288,14	-
D3ZUP1	Protein LOC100365646	154,43	-

D3ZEP6	Uncharacterized protein	190,49	-
P55213	Caspase-3	93,85	-
D4A269	Uncharacterized protein	192,73	-
G3V7H6	Arginase	93,41	-
Q63617	Hypoxia up-regulated protein 1	143,56	-
F1M7Y3	Protein Rap1gds1	104,23	-
M0RCG4	Protein LOC100910474	969,56	-
D3ZXT8	Protein Tgfbrap1	73,94	-
Q08290	Calponin-1	235,07	-
Q62875	Allergin-1	100,46	-
Q7TP19	Cb1-812	90,94	-
M0RCF2	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=1	163,34	-
Q711G3	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	118,84	-
F1LPK7	Plastin 3 (T-isoform), isoform CRA_a	129,54	-
Q8VHV7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	87,89	-
D3ZHS6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1	77,13	-
Q9Z0T0	Thiopurine S-methyltransferase	90,94	-
P01026	Complement C3	69,56	-
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	212,07	-
F1M513	Protein Rufy4	70,34	-
Q63942	GTP-binding protein Rab-3D	236,66	-
Q66HH8	Annexin	278,08	-
Q63941	Ras-related protein Rab-3B	296,38	-
Q32KK2	Arylsulfatase A	96,32	-
F1LPI8	Tyrosine-protein kinase Fer	71,22	-

P70580	Membrane-associated progesterone receptor component 1	289,38	-
Q66HG5	Transmembrane 9 superfamily member 2	102,25	-
P05714	Ras-related protein Rab-4A	236,66	-
M0RCC0	Protein Zfp106	57,3	-
P18163	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	119,9	-
D3ZY17	Protein Rps6ka5	101,42	-
D4AE69	Protein Tmem51	97,45	-
F1LVT1	Protein Zfp827	114,08	-
P20760	Ig gamma-2A chain C region	318,78	-
Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	113,29	-
M0RCB8	Uncharacterized protein (Fragment)	533,83	-
F6T9E7	Protein Selp1g	95,46	-
F7FLS6	Leucine zipper putative tumor suppressor 2	92,16	-
D3ZY08	Protein RGD1559578	76,39	-
F1M4M6	Protein Camta1 (Fragment)	78,05	-
Q4V8H5	Aspartyl aminopeptidase	173	-
Q5FVR5	Acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 2	76,32	-
F1MAF7	Protein Krt33b	113,87	-
P19234	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	161,02	-
P70550	Ras-related protein Rab-8B	236,66	-
Q62812	Myosin-9	85,13	-
D4ADS8	Ras-related protein Rab-4A	236,66	-
P38983	40S ribosomal protein SA	437,73	-
Q5FVP8	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	85,02	-
P51146	Ras-related protein Rab-4B	286,35	-

P43245	Multidrug resistance protein 1	135,79	-
D4A4R7	Protein Serpina1f	81,85	-
P51156	Ras-related protein Rab-26	236,66	-
P50399	Rab GDP dissociation inhibitor beta	149,84	-
P50398	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	109,47	-
P35704	Peroxiredoxin-2	202,57	-
D4A5G8	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	66,36	-
Q53B90	Ras-related protein Rab-43	236,66	-
M0R449	Uncharacterized protein (Fragment)	183,26	-
Q6AYS7	Aminoacylase-1A	85	-
D4A8L8	Protein Fpr2	75,15	-
M0R9K1	Protein Gm7964	74,49	-
P52555	Endoplasmic reticulum resident protein 29	265,25	-
Q68FV4	Uncharacterized protein C17orf74 homolog	99,9	-
Q68FU3	Electron transfer flavoprotein subunit beta	123,7	-
P09117	Fructose-bisphosphate aldolase C	165,16	-
F1LSG4	Protein Zfp746	87,44	-
D4ADN6	Protein Fsd2	155,4	-
O35162	Heat shock 70 kDa protein 13	76,27	-
D3ZEE8	Protein LOC691418	90,57	-
F1M4H7	Protein Smek3 OS=Rattus norvegicus GN=Smek3 PE=1 SV=2	78,51	-
P02767	Transthyretin	213,14	-
Q68FX5	snRNA-activating protein complex subunit 2	83,13	-
Q6AYT7	Monoacylglycerol lipase ABHD12	105,87	-
P07323	Gamma-enolase	251,58	-

Q920L2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	102,06	-
F1LZ24	Protein argonaute (Fragment)	131,45	-
P62959	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	192,73	-
G3V6Y6	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	78,64	-
D4ADL5	Protein Adat1	69,85	-
P25235	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	101,32	-
M0RC91	Protein LOC100909726	634,17	-
A0A0A0MXZ5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1	77,13	-
Q6URK4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	60,22	-
G3V796	Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	67,75	-
F1LM84	Nidogen-1	74,69	-
Q6AXV8	Protein LOC497899	139,88	-
D3ZB81	Protein Slc25a31	196,88	-
P18757	Cystathionine gamma-lyase	107,22	-
F7FEZ6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	111,19	-
P51400	Double-stranded RNA-specific editase 1	67,83	-
Q8VHF5	Citrate synthase, mitochondrial	179,29	-
F1LSA0	Nuclear receptor corepressor 1	79,12	-
F1LYM2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2 (Fragment)	381,99	-
Q6IFX1	Keratin, type I cytoskeletal 24	102,89	-
Q5RJR9	Serine (Or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1, isoform CRA_b	105,48	-
F8WFH8	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	72,67	-
D3ZGL7	Protein Col10a1	73,34	-
Q6MG61	Chloride intracellular channel protein 1	178,83	-
P21702	Prolactin-3D1	78,28	-

D3ZAY5	Uncharacterized protein (Fragment)	128,02	-
Q68FR9	Elongation factor 1-delta	160,82	-
Q68FR7	Protein LTV1 homolog	102,33	-
Q68FR6	Elongation factor 1-gamma	218,61	-
D4A1E8	Protein Lime1	137,18	-
P52873	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	87,68	-
D3ZQX2	Protein Lilrb3	75,19	-
F1M4C6	Protein LOC690568 (Fragment)	77,38	-
D4A1D8	Protein Surf4	72,02	-
F1LM69	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	137,94	-
Q3B7C7	Cell division cycle associated 4	91,3	-
F1LVH3	Protein Lrit3	73,45	-
Q5RKJ9	RAB10, member RAS oncogene family	236,66	-
P14141	Carbonic anhydrase 3	339,49	-
G3V7U4	Lamin-B1	127,32	-
D4A5H3	Uncharacterized protein	645,86	-
G3V7T7	A disintegrin and metalloprotease domain 7, isoform CRA_a	116,19	-
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	125,1	-
D4AEG9	Protein Hesx1	111,2	-
Q5RKI1	Eukaryotic initiation factor 4A-II	113,43	-
F7FLF2	Protein LOC100360057 (Fragment)	132,08	-
P62909	40S ribosomal protein S3	412,18	-
G3V6T1	Coatomer subunit alpha	74,17	-
Q6IFW7	Protein Krt28	117,6	-
P09760	Tyrosine-protein kinase Fer	76,76	-

Q6IFW6	Keratin, type I cytoskeletal 10	172,65	-
Q6IFW2	Keratin, type I cytoskeletal 40 OS=Rattus norvegicus GN=Krt40 PE=3 SV=1	102,89	-
O54858	Carboxypeptidase Z	97,97	-
D3ZAU6	Protein RGD1561919	100,67	-
Q6P7B0	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	72,67	-
G3V9Y1	Myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle, isoform CRA_b	79,39	-
F1MA89	Protein Ccny	116,07	-
Q6IFV5	Protein Krt36	102,89	-
Q6P7A7	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	73,68	-
Q6IFV0	Protein Ka11	72,81	-
Q6IFV4	Keratin, type I cytoskeletal 13	105,98	-
Q6IFV3	Keratin, type I cytoskeletal 15	74,44	-
Q6IFV1	Keratin, type I cytoskeletal 14	84,99	-
F1LN61	Uncharacterized protein	318,78	-
F6SF42	Protein Krt33b	113,87	-
Q64119	Myosin light polypeptide 6	969,56	-
B2RZ57	Mitochondrial ribosomal protein L18	160,54	-
P05197	Elongation factor 2	242,09	-
P13084	Nucleophosmin	350,23	-
Q6AYX5	Outer dense fiber protein 2	160,57	-
B2RZ72	Actin related protein 2/3 complex, subunit 4 (Predicted), isoform CRA_a	197,23	-
Q6AYX2	L-lactate dehydrogenase	163,34	-
D3ZS97	CD226 antigen (Predicted), isoform CRA_b	116,1	-

G3V888	ATP citrate lyase, isoform CRA_a	90,41	-
F1M5C9	Uncharacterized protein (Fragment)	381,99	-
P51886	Lumican	125,97	-
Q5U300	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	91,85	-
M0RCV2	Protein LOC100363436	297,11	-
M0RD73	Uncharacterized protein	183,26	-
G3V741	Phosphate carrier protein, mitochondrial	100,41	-
G3V6S1	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	107,76	-
Q6IFV6	Protein Krt35	102,89	-
Q6IFU7	Keratin, type I cytoskeletal 42	145,4	-
G3V9X2	G-protein signalling modulator 1 (AGS3-like, C. elegans), isoform CRA_c	155,74	-
Q06647	ATP synthase subunit O, mitochondrial	270,26	-
M0RBR2	Protein Ago3 (Fragment)	118,44	-
Q6IFU8	Keratin, type I cytoskeletal 17	88,45	-
B6ID09	Fam117a protein	170,1	-
B0BMZ6	LOC691909 protein	168,57	-
B0BMZ5	LOC687696 protein	76,11	-
P30152	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	109,12	-
Q6AXR4	Beta-hexosaminidase subunit beta	187,2	-
M0R5W3	Uncharacterized protein (Fragment)	196,88	-
D3ZE95	Protein Zfp385c	82,83	-
B1WBY5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 11	91,38	-
G3V6P7	Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	69,6	-
F1LM05	Protein LOC299282	78,9	-
Q63598	Plastin-3	129,54	-
P20070	NADH-cytochrome b5 reductase 3	286,83	-

D4ADC3	Protein Mgst2	100,93	+
F1LVB0	Protein LOC100912642 (Fragment)	67,1	-
Q4L1J4	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	117,47	-
P67779	Prohibitin	296,27	-
Q01177	Plasminogen	92,75	-
Q6PCU3	Aldoc protein	165,16	-
B0BMW0	RAB14, member RAS oncogene family	236,66	-
P15429	Beta-enolase	271,95	-
G3V7X0	Outer dense fiber of sperm tails 2, isoform CRA_e	160,57	-
Q5U316	Ras-related protein Rab-35	236,66	-
M0R3X6	Carbonyl reductase [NADPH] 1	417,87	-
A0A0A0MY44	Butyrophilin-like protein 2	115,75	-
D4A4E7	Protein Tmco2	103,38	-
F7FPR9	Protein LOC100361783	139,46	-
P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	90,42	-
Q4KMC4	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2	80,97	-
Q02253	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	259,45	-
Q9ERE6	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	119,26	-
Q63560	Microtubule-associated protein 6	93,68	-
D3ZAN3	Alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit (Predicted)	78,56	-
P04256	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	111,19	-
Q4KMA2	UV excision repair protein RAD23 homolog B	189,44	-
F1LS83	Nuclear receptor corepressor 1	68,61	-
F1LS82	Nuclear receptor corepressor 1	79,12	-

D3ZQN6	Protein Stac3	179,52	-
D3ZTT1	Protein Medag	79,99	-
D3Z7Z1	Olfactory receptor	72,12	-
P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	93,92	-
M0R631	Protein RGD1563334 (Fragment)	82,78	-
D3ZWX4	NCK interacting protein with SH3 domain (Predicted), isoform CRA_a	89,59	-
G3V9Q3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	87,89	-
P14668	Annexin A5	278,08	-
D3ZH98	Uncharacterized protein	79,3	-
M0RBJ7	Complement C3	96,82	-
M0RBJ6	Protein Fgd5 (Fragment)	100,7	-
Q5J3L1	Protein Vom1r41	87,78	+
Q5J3L0	Protein Vom1r107	66,03	+
Q1PBJ1	Lactadherin	495,09	-
Q6MGB1	Protein LOC100911800	326,22	-
M0R618	Protein Etl4 (Fragment)	65,59	-
D3ZE15	Protein LOC100911483	122,91	-
D3ZQI4	Protein Zfand1	76,01	-
P62271	40S ribosomal protein S18	100,67	-
G3V6H0	Protein LOC100363782	236,66	-
Q6P762	Alpha-mannosidase	103,29	-
M0R5P4	Uncharacterized protein (Fragment)	285,54	-
D3ZE29	Uncharacterized protein (Fragment)	212,46	-
M0R972	Uncharacterized protein	113	-
Q99PD6	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	142,66	-
P63012	Ras-related protein Rab-3A	236,66	-

Q1KZH8	Placental lactogen I alpha	78,28	-
D3ZX77	Bat4	86,86	-
P48679	Prelamin-A/C	103,12	-
D3ZX74	Coenzyme Q10 homolog A (Yeast) (Predicted), isoform CRA_b	86,73	-
D3ZTP0	Protein Aldh112	77,25	-
F1M451	Uncharacterized protein	82,21	-
M0R8U7	Protein Spata17 (Fragment)	117,94	-
M0R964	Uncharacterized protein (Fragment)	78,04	-
D3ZH62	Protein RGD1564730	116,92	-
Q9WVK7	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	104,98	-
M0RBF1	Complement C3	96,82	-
F1LUS2	Protein argonaute (Fragment)	123,18	-
F1LUW3	Uncharacterized protein (Fragment)	182,53	-
M0R5L4	Uncharacterized protein (Fragment)	183,26	-
Q6P9Y4	ADP/ATP translocase 1	292,83	-
D3ZAG6	Protein Lix1	99,72	-
F1M6U3	Protein Pitpnm3 (Fragment)	167,69	-
F7ETI3	Protein Wdr41	66,49	-
D3ZAB7	Protein LOC102554302	105,16	-
Q9QZC5	Growth factor receptor-bound protein 7	148,82	-
D4A0P5	Protein Wdr41	89,01	-
F1M6T7	Protein Erich5 (Fragment)	122,84	-
F1M5F6	Uncharacterized protein (Fragment)	113,18	-
P19629	L-lactate dehydrogenase C chain	163,34	-
P0C548	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2	91,99	-
P35284	Ras-related protein Rab-12	322,82	-

P35281	Ras-related protein Rab-10	241,93	-
P35280	Ras-related protein Rab-8A	236,66	-
D4A463	Protein Tpgs1	122,48	-
O08701	Arginase-2, mitochondrial	93,41	-
G3V9G4	ATP citrate lyase, isoform CRA_b	90,41	-
Q32ZH2	Beta-defensin 20	91,17	-
F1M779	Clathrin heavy chain	93,98	-
M0R5K9	Protein LOC100912024 (Fragment)	100,67	-
F1LUV3	Protein LOC291543 (Fragment)	75,98	-
F1LUV0	Uncharacterized protein (Fragment)	93,64	-
P14604	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	107,02	-
P70490	Lactadherin	501,79	-
D4AA20	Protein Zfp697	105,14	-
F1LXX8	Uncharacterized protein (Fragment)	139,46	-
Q08163	Adenylyl cyclase-associated protein 1	98,55	-
D3ZWQ7	Glutathione peroxidase	89,81	-
P46101	Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6	78,63	-
G3V9J6	Protein Abcb1b	122,51	-
Q3T1L0	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	82,59	-
P30710	Epididymal secretory glutathione peroxidase	89,81	-
D3ZZT9	Protein Coll4a1	79,06	-
M0R5H1	Protein Etl4 (Fragment)	65,59	-
Q99M64	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	70,27	-
P02696	Retinol-binding protein 1	112,87	-
Q6MG97	Butyrophilin-like protein 2	115,75	-
Q4KLY0	Centrosomal protein of 63 kDa	50,73	+

F7FKR3	Protein Zfp385a	76,66	+
B0K035	Mitochondrial fission regulator 2	54,18	+
P30713	Glutathione S-transferase theta-2	132,61	+
P02693	Fatty acid-binding protein, intestinal	97,02	+
M0R5G1	Uncharacterized protein	82,19	-
D3ZN70	Nuclear receptor corepressor 1	68,61	-
P05943	Protein S100-A10	190,49	-
P46413	Glutathione synthetase	90,14	-
P10536	Ras-related protein Rab-1B	236,66	-
P26284	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	66,36	-
A0A096MKG2	Protein Nol6	72,48	-
F1LUQ5	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 4 (Predicted)	76,37	-
G3V9F3	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	119,26	-
M0R5F7	Protein LOC690400	154,43	-
P61107	Ras-related protein Rab-14	236,66	-
F7FED4	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus PE=4 SV=1	183,26	-
P00489	Glycogen phosphorylase, muscle form	83,46	-
P62890	60S ribosomal protein L30	217,27	-
P02650	Apolipoprotein E	180,74	-
D4A3P7	Protein RGD1560513	619,66	-
Q9EQS4	Cystathionase (Cystathionine gamma-lyase)	107,22	-
D3ZZN3	Acetyl-coenzyme A synthetase	97,03	-
Q5RJN9	Uncharacterized protein C14orf79 homolog	75,99	-
M0R8G3	Uncharacterized protein	84,58	-
Q4KLN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF8	68,86	-
D4A0G7	Protein LOC100364984	236,66	-

F1M9V3	Enolase (Fragment)	133,02	-
Q9EQP5	Prolargin	133,04	-
D4A9Y0	Protein Sdf211	85,25	-
F1LUK2	Uncharacterized protein (Fragment)	141,41	-
M0R8F9	Protein Gm17555 (Fragment)	183,26	-
M0RAX9	Protein Npnt	99,32	-
Q641Y7	8-oxo-dGDP phosphatase NUDT18	74,52	-
D3ZTB7	Protein Gm17190	84,1	-
Q4V7B0	Uncharacterized protein C9orf117 homolog	84,03	-
P10868	Guanidinoacetate N-methyltransferase	135,82	-
Q641Y0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	137,94	-
F1M3D3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	64,29	-
P53534	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	78,64	-
F7FKI5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	66,36	-
Q9Z2M4	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	73,76	-
P62839	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	381,99	-
Q9JLT0	Myosin-10	81,66	-
M0R8D4	Protein Npnt OS=Rattus norvegicus GN=Npnt PE=4 SV=1	99,32	-
P07153	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	73,68	-
P07150	Annexin A1	116,68	-
G3V678	Protein LOC100912534	84,26	-
F1LV13	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	64,29	-
F1LUM5	Protein Tubal3	119,43	-
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	79,58	-
P62824	Ras-related protein Rab-3C	236,66	-

F1M6H0	Protein Etl4 (Fragment)	68,7	-
Q9Z2F5	C-terminal-binding protein 1	139,55	-
D4A6J0	IQ calmodulin-binding motif containing 1 (Predicted), isoform CRA_a	79,79	-
G3V8V3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	83,46	-
P47198	60S ribosomal protein L22	169,75	-
G3V8V1	Granulin, isoform CRA_c OS=Rattus norvegicus GN=Grn PE=4 SV=1	107,9	-
M0R4V7	Protein Npnt OS=Rattus norvegicus GN=Npnt PE=4 SV=1	99,55	-
M0R4V4	Protein Slc25a23	165,22	-
E9PU16	Ras-related protein Rab-1A	236,66	-
M0RA31	Protein Enox1	84,58	-
D3ZBZ9	Protein Ttc33	143,75	-
Q3MIE4	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	136,05	-
Q6V7V2	Rhotekin	87,12	-
Q5XI73	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	128,86	-
P16036	Phosphate carrier protein, mitochondrial	94,81	-
B2GV82	Nle1 protein	65,53	-
M0RA88	Protein Aldh1l2 (Fragment)	77,25	-
D3ZM33	Protein LOC100362298 (Fragment)	100,67	-
F1LQB3	Protein LOC100912634	78,28	-
O35264	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	169,23	-
E9PSU5	Uncharacterized protein	208,66	-
D3ZYM3	Protein Enox1	93,9	-
D4A641	Protein LOC690386	154,43	-
Q5XHX8	Testicular haploid expressed gene protein	104,16	-
Q71UE8	NEDD8	97,74	-

P70712	Kynureninase	70,48	-
E9PU76	Protein LOC100364078	139,46	-
P24368	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	271,18	-
Q63180	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7	116,19	-
Q794E4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	124,1	-
P01830	Thy-1 membrane glycoprotein	81,19	-
D3ZCZ3	Protein Cys1	190,16	-
D3ZA50	Protein Klhl15	167,36	-
P32232	Cystathionine beta-synthase	104,54	-
F7F1Q9	Protein Vom1r65	102,61	-
Q4V797	Interferon-gamma-inducible GTPase Ifgga1 protein	105,74	-
M0RAQ7	Uncharacterized protein	121,04	-
D3ZJF4	Uncharacterized protein (Fragment)	208,66	-
Q5U2X0	CDKN2A-interacting protein	85,77	-
Q3LUD4	Leucine zipper putative tumor suppressor 2	92,16	-
Q497B0	Omega-amidase NIT2	99,7	-
Q6XFR6	Glycophorin-C	148,43	-
D3ZIQ1	Protein Acot4	101,52	-
D3ZZ13	Protein Sox12	93,83	-
A0A096MJE0	Protein Krt32 (Fragment)	102,89	-
P47727	Carbonyl reductase [NADPH] 1	417,87	-
F1LZZ2	Uncharacterized protein	208,66	-
F1M5M8	Protein LOC100364984	236,66	-
D4A6N8	Protein Tbr1	80,45	-
G3V649	Double-stranded RNA-specific editase 1	67,83	-
G3V960	Guanidinoacetate N-methyltransferase	135,82	-

E9PTT8	Cysteine-rich secretory protein 1	118,58	-
D3ZLY5	Protein RGD1564171	138,72	-
B5DEY0	Pls1 protein	232,62	-
D4AC20	Cytidine deaminase (Predicted)	104,59	-
D4ABQ0	Protein LOC100362916	85,86	-
B5DF65	Biliverdin reductase B (Flavin reductase (NADPH))	410,4	-
D3ZM91	Protein Sync	73,23	-
D4AC15	Protein Tectb	84,5	-
Q5U2X8	Acyl-CoA thioesterase 9	87,58	-
D3ZVH2	Protein RGD1560831	106,33	-
M0R584	Uncharacterized protein (Fragment)	111,19	-
Q5HZE8	Transmembrane protein 59-like	66,97	-
P07448	Dentinal fluid transport-stimulating peptide	714,74	-
D3ZSV9	Pleckstrin homology domain containing, family A member 5, isoform CRA_c	72,22	-
F1LQZ9	Microtubule-associated protein 6	72,72	-
M0R4U4	Triosephosphate isomerase (Fragment)	499	-
A4KWA8	C-type lectin domain family 2 member D6	85,82	-
B5DFI7	Glutaminy-peptide cyclotransferase-like	90,57	-
D3ZCV0	Protein Actn2	125,07	-
P32551	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	107,14	-
F1M2Y8	Protein Zfp827	106,14	-
P16409	Myosin light chain 3	634,17	-
Q4QR72	Protein MGC114529	90,37	-
P04166	Cytochrome b5 type B	435,93	-
F1M9B1	Protein LOC100912008 (Fragment)	100,65	-
Q07936	Annexin A2	183,49	-

D3ZD56	Ferritin	69,92	-
P08503	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	67,75	-
A0A096MJW7	Protein Smek3	70,93	-
E9PTM0	Protein Eddm3b	85,86	-
M0RAJ0	Uncharacterized protein (Fragment)	183,26	-
M0RAF1	Protein Aldh112 (Fragment)	77,25	-
D3ZMA1	Protein Hoxb5	73,85	-
F1LR87	Beta-hexosaminidase	168,96	-
G3V936	Citrate synthase	177,11	-
P05544	Serine protease inhibitor A3L	78,9	-
Q91ZV2	Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2	241,88	-
M0RAI9	Protein Nelfcd (Fragment)	245,22	-
F1LTZ6	Protein RGD1559921 (Fragment)	574,19	-
M0RAE7	Uncharacterized protein	83,46	-
M0RAE2	Uncharacterized protein	183,26	-
M0RDK4	Protein Pitpnm3 (Fragment)	167,69	-
P61078	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	381,99	-
Q5D059	Hnrpk protein	90,42	-
G3V8L3	Lamin A, isoform CRA_b	99,3	-
D3ZD09	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	847,56	-
Q5PQQ7	LIX1-like protein	302,45	-
B4F7A5	Cd99 protein	147,42	-
D4A6A2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	60,22	-
D4A9F7	Protein Serpine3	96,08	-
D3ZG37	Protein Ppp6r1	71,17	-
A0A096MK07	Uncharacterized protein	60,56	-

D3ZYW2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	87,89	-
E9PTD9	Toll-like receptor	66,59	-
D3ZCK4	Protein Def6	69,99	-
M0R7L5	Protein LOC100912008 (Fragment)	72,02	-
D4A376	Ras-related protein Rab-12	322,82	-
P04785	Protein disulfide-isomerase	129,54	-
M0R4G0	Protein LOC100910729	90,17	-
P29457	Serpin H1	82	-
D4A9C5	Uncharacterized protein	73,24	-
D3ZYU0	Enolase	228,82	-
Q02765	Cathepsin S	94,33	-
Q9JHY1	Junctional adhesion molecule A	88,83	-
Q62627	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	160,84	-
D3ZCJ0	Protein Pitpnm3	167,69	-
D4A007	Protein Smek3	83,95	-
G3V8H3	Glutathione S-transferase Yb-3	236,2	-
Q304F3	Protein Tnnc2	645,86	-
Q63716	Peroxiredoxin-1	601,22	-
D3ZPC3	Protein Tlcd2	53,2	+
F1M648	Uncharacterized protein (Fragment)	46,36	+
B5DF62	Protein Pak4	54,62	+
F1M2F7	Uncharacterized protein	51,34	+
P01835	Ig kappa chain C region, B allele	207,07	+
D3ZQ18	Protein Nccrp1	74,49	+
Q63483	Protein Rab38	90,76	+
D3ZGC8	Uncharacterized protein	56,54	+

F1LQZ0	Protein Tmem65	44,79	+
O88751	Calcium-binding protein 1	106,11	+
E9PTT9	Uncharacterized protein (Fragment)	51,31	+
M0RB33	Uncharacterized protein (Fragment)	80,27	+
P17164	Tissue alpha-L-fucosidase	94,45	+
D3ZFH4	Hypothetical LOC314467 (Predicted)	54,09	+
Q5U2W8	Protein Pot1	65,62	+
D3ZYM6	Protein Calr4	65,74	+
D3ZJI7	Protein Serpinb11	64,83	+
Q4KLI9	F-box/WD repeat-containing protein 5	74,73	+
Q9QZ58	Heat shock protein beta-3	50,2	+
E9PSY2	Protein Mageb4	56,88	+
P52481	Adenylyl cyclase-associated protein 2	79,97	+
Q6MG75	Protein Nelfe	80,84	+
A0A096MKD8	Protein Unc5cl	46,32	+
D4A2K1	Protein Hoga1	128,47	+
Q5XI79	NADH dehydrogenase [ubiquinone] complex I, assembly factor 7	59,27	+
D3ZJ76	Protein C1qtnf9	54,95	+
A0A096MIT3	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	38,85	+
D4ABI6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	61,99	+
B2GV73	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	51,87	+
D3ZM01	Protein RGD1562381	188,42	+
P09215	Protein kinase C delta type	41,14	+
A1L1L8	EH domain binding protein 1-like 1	64,55	+
Q5XI34	Protein Ppp2r1a	73,12	+
P0C0A9	Small VCP/p97-interacting protein	70,97	+

M0R8Z0	Protein Astn2 (Fragment)	38,89	+
M0R647	Protein LOC100911144	60,85	+
Q5XI28	Ribonucleoprotein PTB-binding 1	39,36	+
Q91Y78	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	91,87	+
F1M0V9	Protein LOC100362774	50,8	+
F1LVD9	Uncharacterized protein (Fragment)	345,47	+
B2RYU0	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2 (Predicted), isoform CRA_b	68,18	+
P04094	Proenkephalin-A	89,43	+
G3V7V3	Protein Slc27a4	40,25	+
F1M5A1	Protein Calr4 (Fragment)	65,74	+
M0RC75	Uncharacterized protein (Fragment)	195,52	+
D3ZHE1	Protein Klhl8	43,54	+
E9PSN4	Protein Zc3h13	72,51	+
D3ZKR3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	90,7	+
Q68FX6	Calcium-binding and spermatid-specific protein 1	91,27	+
Q66HA7	Core-binding factor, beta subunit	78,91	+
B5DEH2	Erlin-2	90,79	+
D3ZIA7	Anterior gradient 2 (Xenopus laevis) (Predicted), isoform CRA_a	46,06	+
D3ZV85	Uncharacterized protein (Fragment)	60,85	+
F1M286	Protein Fance (Fragment)	45,25	+
M0RCJ8	Protein Krt78	65,84	+
Q6T5E8	Protein LOC100912040	67,05	+
Q6AYL1	Npap60 protein	98,74	+
M0R798	Uncharacterized protein (Fragment)	119,1	+
A0A096MIU4	Centrosomal protein of 63 kDa	50,73	+

P38062	Methionine aminopeptidase 2	79,25	+
D3ZV85	Uncharacterized protein (Fragment)	60,85	+
M0R9Z5	Protein Irf2bp2	64,81	+
Q6PDU1	Serine/arginine-rich splicing factor 2	53,71	+
D3ZKY4	Protein Prdm13	67,59	+
F1M4S6	Uncharacterized protein (Fragment)	62,35	+
Q62888	Neurologin-2	59,07	+
G3V7G6	Heat shock 27kDa protein 3	50,2	+
Q6TXG4	LRRGT00035	63,34	+
D4A224	Protein RGD1310016	44,58	+
O89035	Mitochondrial dicarboxylate carrier	59,27	+
Q4V8I7	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8A	48,93	+
D3Z8R4	Protein Rbm2511	78,29	+
R9PXZ8	Small VCP/p97-interacting protein	70,97	+
D4A539	Protein Ehbp111	70,36	+
O88275	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	39,29	+
F1LSJ2	Uncharacterized protein (Fragment)	82,31	+
Q4V8E4	Cilia- and flagella-associated protein 36	86,69	+
F1LYK6	tRNA (guanine(37)-N1)-methyltransferase	49,75	+
D3ZNB8	Protein RGD1310016	44,58	+
Q9WVK3	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	38,85	+
M0R615	Protein Unc5cl	46,32	+
Q4V7E8	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	43,3	+
Q0D2L4	INO80 complex subunit B	119,6	+
M0R5B9	Uncharacterized protein	82,41	+

Q71RJ2	Voltage-dependent calcium channel gamma-2 subunit	82,34	+
D3ZCI9	Uncharacterized protein (Fragment)	76,38	+
B5DEY7	Neurogenic differentiation factor	61,16	+
Q8CH93	Hyaluronan synthase 1	46,61	+
F1LTW6	Protein Foxr1	51,43	+
D3ZW92	Protein Fam78a	77,3	+
A0A096MK06	Protein Astn2	45,59	+
D3ZSK3	Protein Peli2	46,41	+

ANEXO



PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise proteômica do epidídimo em resposta à exposição por contaminantes ambientais", protocolado sob o CEUA nº 1289080915, sob a responsabilidade de **Camila Peres Buzalaf e equipe; Maria Fernanda Silva De Almeida; Aline De Lima Leite; Mariana Liessa Rovis Sanches** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) em reunião de 04/11/2015.

We certify that the proposal "Proteomic analysis of the epididymis in response to exposure to environmental contaminants.", utilizing 50 Heterogenics rats (50 males), protocol number CEUA 1289080915, under the responsibility of **Camila Peres Buzalaf and team; Maria Fernanda Silva De Almeida; Aline De Lima Leite; Mariana Liessa Rovis Sanches** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 11/04/2015.

Vigência da Proposta: de 05/2015 a 12/2015

Área: Pró-reitoria De Pesquisa E Pós-graduação

Procedência: Biotério Central

Espécie: Ratos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 21

N: 50

Linhagem: Wistar

Peso: 150g

Nota: Os avanços da vida moderna têm sido acompanhados por variados impactos ambientais com implicações na saúde humana. Dentre esses, pode-se propor o aumento dos casos de infertilidade masculina, o que constitui um problema comum em todo o mundo. O metilmercúrio e bifenóis policlorinados (PCBs) constituem contaminantes encontrados em diversos compartimentos ambientais, e devido às suas propriedades físico-químicas, possuem grande capacidade de bioacumulação e biomagnificação nos seres humanos acarretando em diversos efeitos tóxicos em vários sistemas e/ou órgãos, incluindo o sistema reprodutivo. Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos pelo processo de espermatogênese, seguido da diferenciação celular, processo denominado espermiogênese. Após a síntese, os mesmos são direcionados ao epidídimo, onde sofrem o processo de maturação que confere aos espermatozoides a aquisição da mobilidade celular e a capacidade de fertilização. Esse processo é dependente da interação de proteínas secretadas pelo epitélio epididimal com as proteínas espermáticas, as quais passam por diversas modificações pós-transacionais durante o trânsito no epidídimo. O fato de os espermatozoides apresentarem uma capacidade limitada de biossíntese protéica, porém alta na ocorrência de alterações pós-testiculares, a proteômica é uma ferramenta que abre possibilidades no entendimento geral da dinâmica da função dessa célula com impacto na reprodução, que podem ou não estar associados com a exposição aos contaminantes como o metilmercúrio e os PCBs. No entanto, pouco se sabe sobre o perfil proteico do epidídimo de ratos em resposta à exposição ao metilmercúrio associado ou não com os PCBs, em doses que mimetizam aquelas provocadas por intoxicações em humanos. Assim, o objetivo desse projeto é avaliar, qualitativa e quantitativamente, as proteínas do epidídimo em ratos expostos por metilmercúrio associado ou não aos PCBs por análise proteômica, já que os mesmos podem apresentar efeitos antagonísticos, sinérgicos, e ou aditivos. Assim, pretende-se identificar proteínas nucleares e da membrana do esperma bem como do epidídimo importantes para a motilidade e capacitação, que possam ser alvos da toxicidade provocada por esses contaminantes encontrados no ambiente, os quais a população humana está exposta.

Bauru, 05 de novembro de 2015

Prof. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração