

Mayara Ferreira Brito

Associação dos fatores bioclimáticos com as características espermáticas pós-descongelamento e com o perfil proteômico do plasma seminal de bubalinos (*Bubalus bubalis*), criados em clima tropical úmido

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Marc Henry

Co orientadores: Prof. Arlindo Moura

Profª. Maria Isabel Vaz de Melo

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2018

B862a Brito, Mayara Ferreira, 1988-
Associação dos fatores bioclimáticos com as características espermáticas pós-descongelamento e com o perfil proteômico do plasma seminal de bubalinos (*Bubalus bubalis*), criados em clima tropical úmido / Mayara Ferreira Brito. – 2018.
114 p. : il.

Orientador: Marc Henry
Co-orientadores: Arlindo Moura, Maria Isabel Vaz de Melo
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Búfalo – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Análise – Teses. 3. Criopreservação – Teses.
4. Proteômica – Teses. 5. Reprodução animal – Teses. I. Henry, Marc Roger Jean Marie.
II. Moura, Arlindo. III. Melo, Maria Isabel Vaz de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. V. Título.

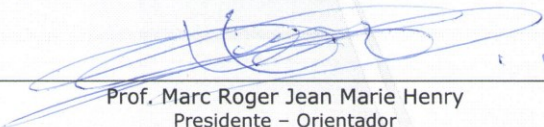
CDD – 636.293 089 26

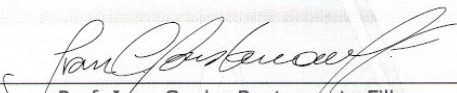
FOLHA DE APROVAÇÃO

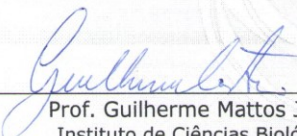
MAYARA FERREIRA BRITO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em REPRODUÇÃO ANIMAL.

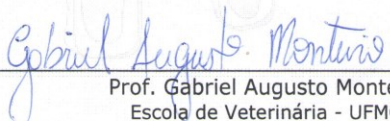
Aprovada em 02 de Maio de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
Presidente – Orientador


Prof. Ivan Cunha Bustamante Filho
Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES


Prof. Guilherme Mattos Jardim Costa
Instituto de Ciências Biológicas- UFMG


Profª. Leticia Zoccolaro Oliveira
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. Gabriel Augusto Monteiro
Escola de Veterinária - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627 -
Caixa Postal 567 – CEP 30123-970
Belo Horizonte – Minas Gerais
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)
www.vet.ufmg.br
E-mail: cap@vet.ufmg.br



AGRADECIMENTOS

À Escola De Veterinária da UFMG e ao Colegiado de Pós-graduação em Ciência Animal agradeço pela disponibilidade de infraestrutura e possibilidade de realização do doutorado;

À CAPES agradeço pela concessão de bolsa de estudos;

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico da Rede de Plataformas da FIOCRUZ pelo uso da plataforma de Citometria de Fluxo, e aos pesquisadores Olindo Martins Filho e Márcio Araújo pela colaboração e parceria;

Ao Prof Marc Henry, além de orientador da pesquisa de doutorado, também da carreira profissional e mais ainda da vida! Agradeço por todos os conselhos, puxões de orelha, lições de vida e carinho com que sempre me acolheu;

À Profa Maria Isabel Vaz de Melo, por mais uma etapa de parceria incansável, de torcida constante e de incentivos sem fim. Agradeço o imenso prazer de poder lhe ter como “mãe científica” eternamente;

Ao Prof Arlindo Moura, pelo ensinamento e contribuições, e sobretudo por ter escancarado as portas do seu laboratório na UFC para a realização dos experimentos em proteômica;

Aos fraternos amigos conquistados durante a estadia em Fortaleza, sobretudo Arabela, Aderson, Moemia, Dayanne, Mônica, Mayra e David, por todas as horas de corridas de gel regadas a muita risada e compreensão;

Aos companheiros de jornada acadêmica Jaci, Verônica, Camila, todos os estagiários e colegas que passaram pelos búfalos e que me proporcionaram tanta ajuda, parceria, comprometimento e alegrias; em especial agradeço às queridas Beatriz e Patrícia, que mantiveram as atividades do experimento, mesmo na minha ausência, com carinho e comprometimento próprios;

Aos demais professores da EV-UFMG e membros da banca de avaliação pelas colaborações e disponibilidade infinitas;

Aos funcionários da Fazenda Modelo UFMG, com um carinho e agradecimento eternos ao Marcelino e sua família, com quem continuo a aprender (ou pelo menos tentar) a manter o sorriso no rosto e a enxergar as adversidades pelo lado do “copo meio cheio”;

Aos amigos antigos e novos, pelo apoio, compreensão e por proporcionar os momentos de fuga da realidade, tão necessários para se manter a cabeça no lugar e a mente sã;

E à minha família inteira, sobretudo Elba, Brito, Ludmila e Wellerson, com os quais toda essa luta faz sentido e onde o conforto e o colo seguro são garantidos. A vocês dedico mais essa etapa vencida da minha vida!!

Sumário

RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	14
1. Aspectos na espermatogênese de búfalos	14
2. Maturação espermática	15
3. Puberdade e maturidade sexual.....	17
4. Sazonalidade reprodutiva no macho bubalino	17
5. Composição do plasma seminal	19
5.1. Componentes não proteicos do plasma seminal	20
5.1.1 <i>Minerais</i>	20
5.1.2 <i>Açúcares</i>	21
5.1.3 <i>Lipídeos</i>	22
5.2 Componentes proteicos do plasma seminal.....	22
CAPÍTULO 2 – ASSOCIAÇÃO DA SAZONALIDADE COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE BÚFALOS (<i>BUBALUS BUBALIS</i>) CRIADOS EM CLIMA TROPICAL ÚMIDO	25
1. Introdução.....	25
2. Material e métodos	25
2.1. Local, período e caracterização climática	25
2.2. Animais e processamento do sêmen.....	27
2.3. Análises laboratoriais do sêmen após o descongelamento	27
2.3.1. <i>Cinética espermática medida com CASA</i>	27
2.3.2. <i>Análises de citometria de fluxo</i>	28
2.3.3. <i>Integridade da membrana plasmática – teste hiposmótico</i>	29
2.4. Análise estatística	29
3. Resultados	30
4. Discussão	35
5. Conclusão	37
CAPÍTULO 3 – VARIAÇÕES SAZONAIS NA INTENSIDADE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE BÚFALOS CRIADOS EM CLIMA TROPICAL ÚMIDO: RESULTADOS PRELIMINARES	38
1. Introdução.....	38

2.	Material e métodos	38
2.1.	Local e animais experimentais	38
2.2.	Avaliação do sêmen e coleta do plasma seminal	39
2.3.	Preparação do plasma seminal e SDS-PAGE	39
2.4.	Análise estatística	40
3.	Resultados	40
4.	Discussão	44
5.	Conclusão	45
CAPÍTULO 4 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A SAZONALIDADE E A COMPOSIÇÃO PROTEICA DO PLASMA SEMINAL E CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE BÚFALOS (<i>BUBALUS BUBALIS</i>) CRIADOS EM CLIMA TROPICAL ÚMIDO		
1.	Introdução.....	45
2.	Material e métodos	46
2.1.	Caracterização do clima e desenho experimental	46
2.2.	Animais, coleta e processamento do sêmen.....	47
2.3.	Análises da qualidade seminal após descongelamento.....	48
2.3.1.	<i>Cinética espermática medida com CASA</i>	48
2.3.2.	<i>Análises de citometria de fluxo</i>	49
2.3.3.	<i>Integridade da membrana plasmática – teste hiposmótico</i>	49
2.4.	Avaliação do perfil proteico do plasma seminal.....	49
2.4.1.	<i>Eletroforese bi-dimensional (2D SDS-PAGE)</i>	49
2.4.2.	<i>Análise das imagens dos géis</i>	50
2.4.3.	<i>Identificação das proteínas por espectrômetro de massas com ionização por electrospray acoplado a analisadores quadrupolo e tempo de voo (ESI/Q-ToF)</i>	50
2.4.4.	<i>Ontologia gênica e rede de interações proteína-proteína</i>	51
2.5.	Análise estatística	51
3.	Resultados	51
4.	Discussão	57
4.1.	Característica seminais após o descongelamento	57
4.2.	Principais proteínas do plasma seminal de búfalos.....	58
4.3.	Proteínas diferencialmente expressas de acordo com a estação.....	60
5.	Conclusão.....	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS		63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios dos quadrados mínimos (\pm erro padrão) das variáveis climáticas obtidas no Setor de Estudos Climatológicos do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA) nos períodos de agosto e setembro/2014 (Inverno, Ano 1), fevereiro e março/2015 (Verão, Ano 1), agosto e setembro/2015 (Inverno, Ano 2) e fevereiro e março/2016 (Verão, Ano 2).
- Tabela 2 - Associação da estação e do ano da coleta do sêmen com as variáveis cinéticas seminais (média dos quadrados mínimos \pm erro padrão) imediatamente após o descongelamento (0h) de touros búfalo criados em clima tropical úmido.
- Tabela 3 - Associação da estação e ano de coleta do sêmen com a longevidade das características cinéticas (média dos quadrados mínimos \pm erro padrão) de espermatozoides incubados a 37°C durante duas horas (representada pela queda dos parâmetros entre 0h e 2h) de touros búfalo criados em clima tropical úmido.
- Tabela 4 - Associação do ano e estação de coleta com as características de integridade estrutural da membrana plasmática (Sybr⁺/PI⁻), integridade da cromatina (IDF total) e integridade funcional da membrana plasmática (HOST⁺) de espermatozoides após o descongelamento, de búfalos criado em clima tropical úmido (média dos quadrados mínimos \pm erro-padrão).
- Tabela 1- Média e desvio-padrão das variáveis seminais, imediatamente após a coleta, de búfalos mantidos em regime de criação extensivo, coletados nas épocas inverno (agosto/setembro) e verão (fevereiro/março).
- Tabela 1- Variáveis climáticas (média \pm desvio padrão) obtidas no inverno (agosto – setembro/2014) e verão (fevereiro – março/2015), selecionadas para a coleta de sêmen de touros búfalo criados em regime extensivo.
- Tabela 2 – Parâmetros de qualidade do sêmen (média \pm erro padrão) após o descongelamento (0h) e após duas horas de incubação a 37°C (representada pelo valor da redução dos parâmetros cinéticos entre 0h e 2h), de ejaculados coletados de touros búfalo, sob regime de criação extensivo, em relação às épocas de coleta do sêmen (inverno X verão).
- Tabela 3 – Proteínas do plasma seminal de búfalos com maior expressão no inverno (CPQ e ALB) e no verão (PIGR, FETUB, ACRBP, A2M e SOD), identificadas por eletroforese 2D e espectrometria de massas (ESI-Q-Tof). Número dos spots se referem à Figuras 3 e ao Anexo 1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Média mensal das variáveis temperatura média (°C) e umidade relativa do ar (%) e precipitação acumulada mensal (mm), obtidas no período de junho de 2014 a maio de 2016, no Setor de Estudos Climatológicos, do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA).
- Figura 2 – Avaliação dos espermatozoides de búfalos utilizando citometria de fluxo. As análises de integridade estrutural de membrana plasmática, utilizando sonda fluorescente Sybr green (detectada pelo fotodetector FL-1, indicada no eixo X) e sonda fluorescente Iodeto de Propideo (detectada pelo fotodetector FL-3, indicado no eixo Y). Análise da estrutura da cromatina espermática usando sonda fluorescente Laranja de Acridina, detectada pelo fotodetector FL-3, indicado no eixo X (a – grupo de células principais; b – grupo de DNA não fragmentado; c – grupo de DNA de baixa fragmentação; d – grupo de média fragmentação de DNA; e – grupo de alta fragmentação de DNA; c+d+e – índice de fragmentação total).
- Figura 1 – A: Perfil uni-dimensional das proteínas do plasma seminal de búfalos separado por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%, evidenciando as bandas de proteínas presentes em todos os animais. B: Mapa das intensidades das bandas detectadas em A.
- Figura 2 – Perfil proteico do plasma seminal de búfalos coletados no inverno (agosto/setembro) (géis A e B) e verão (fevereiro/março) (géis C e D).
- Figura 3 – Diferença na intensidade de expressão das bandas de proteínas do plasma seminal diferencialmente expressas entre as amostras coletadas no inverno e verão. Letras diferentes sobrescritas nas barras indicam diferença significativa ($P < 0.05$).
- Figura 1 – Precipitação acumulada e índice de temperatura e umidade (ITU*) obtidos no período de junho/2014 a maio/2015, na cidade de Pedro Leopoldo, MG, Brasil (19°37'04''S, 44°02'34''O). *ITU calculado pela fórmula proposta por Marai et al. (2001).
- Figura 2 – Mapa bidimensional das proteínas identificadas do plasma seminal de búfalos gerado pelo programa PDQuest (Bio-Rad), baseado na análise dos vinte quatro géis produzidos no estudo (spots consistentemente presentes em todos os géis). A descrição detalhada das proteínas identificadas encontra-se no Anexo 1. As proteínas foram identificadas por eletroforese 2D e espectrometria de massas (ESI-Q-Tof).
- Figura 3 – Processos biológicos e funções moleculares das proteínas identificadas (presentes de forma consistente em todos os 24 géis produzidos no estudo) por espectrometria de massas gerados pelo software STRAP. Os termos da ontologia gênica foram obtidos no banco de dados UniProt.
- Figura 4 – Diferença na intensidade (média \pm SEM) dos spots de proteínas diferencialmente expressas entre as amostras coletadas no inverno e no verão. Número dos spots se referem à Tabela 3 e ao Anexo 1. Letras diferentes mostram intensidades significativamente diferentes pelo teste t ($P < 0.05$).
- Figura 5 – Rede de interações proteína-proteína das proteínas diferencialmente expressas no plasma seminal coletado no inverno e no verão. A rede foi gerada no software STRING.

RESUMO

O objetivo geral dessa tese foi avaliar as associações da sazonalidade e do clima tropical úmido com as características seminais de búfalos criados em regime extensivo, com suplementação no período de seca. Foram utilizados ao longo dos experimentos de seis a nove touros búfalos da raça Murrah, submetidos a regime semanal de coleta de sêmen com auxílio de vagina artificial aquecida, durante os períodos de junho de 2014 a maio de 2016. As amostras de sêmen foram selecionadas quanto a sua qualidade espermática imediatamente após a coleta e então submetidas ao processo de congelamento em máquina computadorizada, diluídas em diluidor comercial. Após o descongelamento as amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática (por metodologia CASA), integridade funcional de membranas (teste hiposmótico), integridade estrutural de membrana plasmática e integridade da cromatina espermática (citometria de fluxo). As características seminais após o descongelamento foram comparadas de acordo com a época da realização da coleta do sêmen. Amostras de plasma seminal foram obtidas por centrifugações sucessivas das amostras de sêmen e posteriormente submetidas a dosagens de proteína total do plasma seminal, separação de bandas proteicas (SDS-PAGE) e mapa da distribuição de spots de proteínas (2D SDS-PAGE). Os spots de proteínas predominantes, bem como àqueles diferencialmente expressos entre os períodos de coleta de sêmen, foram identificados utilizando espectrômetro de massas (ESI-Q-ToF). Nesse estudo foi possível perceber a associação das variáveis climáticas sobre a resistência espermática ao congelamento, e sobre o padrão de distribuição de proteínas no plasma seminal. Em situações de pico do índice de pluviosidade (atípico), obtiveram-se maiores valores dos parâmetros cinéticos (exceto LIN) e de integridade estrutural e funcional da membrana plasmática. Na ausência de valores extremos de chuva, foram obtidos maiores valores de cinética espermática (exceto MT, LIN e BCF) no período de menor estresse térmico, estimado pelo índice de temperatura e umidade (ITU). Quanto a quantificação de proteínas total do plasma seminal, não houve diferença entre os períodos estudados, entretanto houve mudança no padrão de expressão de certas proteínas. As proteínas carboxipeptidase Q e albumina foram mais intensamente expressas em período de menor ITU, já as proteínas fetuina B, receptor de imunoglobulina polimérica, ligadora de acrosina, macroglobulina alfa2 e superóxido dismutase extracelular foram mais expressas no período de maior ITU (maior estresse térmico estimado). O proteoma principal do plasma seminal de búfalos foi pela primeira vez descrito, sendo as proteínas com maior intensidade de expressão as isoformas da família das secretoglobinas, espermadesinas Z13, clusterinas, família das BSP, albumina e zinco-alfa2-glicoproteínas.

Palavras-chave: búfalo, líquido seminal, proteínas, criopreservação, regime extensivo.

ABSTRACT

The general objective of this thesis was to evaluate the associations of seasonality and tropical humid climate with the seminal characteristics of buffaloes raised in an extensive regime, with supplementation in the dry season. Six to nine buffalo bulls of the Murrah breed were used throughout the experiments, under a weekly regimen of semen collection with the aid of a heated artificial vagina, during the periods from June 2014 to May 2016. The semen samples were selected on their spermatoc quality immediately after the collection and then submitted to the process of computerized freezing, diluted in commercial diluent. After thawing, the samples were evaluated for spermatoc kinetics (CASA method), membrane functional integrity (hyposmotic test), structural integrity of plasma membrane and integrity of sperm chromatin (flow cytometry). Sperm characteristics after thawing were compared according to the time of semen collection. Seminal plasma samples were obtained by repeated centrifugation of the semen samples and then submitted to total seminal plasma protein, protein band separation (SDS-PAGE) and protein spot distribution (2D SDS-PAGE) assays. The predominant protein spots, as well as those differentially expressed between the semen collection periods, were identified using mass spectrometer (ESI-Q-ToF). In this study it was possible to observe the association of climatic variables on sperm resistance to freezing, and on the protein distribution pattern in seminal plasma. In peak conditions of the (atypical) rainfall index, higher values of kinetic parameters (except LIN) and structural and functional integrity of the plasma membrane were obtained. In the absence of extreme rain values, higher values of spermatoc kinetics (except MT, LIN and BCF) were obtained in the period of lower thermal stress, estimated by the temperature and humidity index (THI). Regarding the total protein quantification of the seminal plasma, there was no difference between the periods studied, however, there was a change in the expression pattern of certain proteins. The carboxypeptidase Q proteins and albumin were more intensely expressed in the period of lower THI, whereas the fetuin B proteins, polymeric immunoglobulin receptor, acrosin binding, alpha2 macroglobulin and extracellular superoxide dismutase were more expressed in the period of higher THI (higher thermal stress). The main proteome of the seminal plasma of buffaloes was first described, the proteins with the highest expression intensity being the isoforms of the secretoglobin family, spermadesin Z13, clusterins, BSP family, albumin and zinc-alpha2-glycoproteins.

Keywords: buffalo, seminal fluid, proteins, cryopreservation, extensive regime.

INTRODUÇÃO GERAL

O início da criação de bubalinos no Brasil datam oficialmente de 1902 quando os primeiros animais foram importados da Itália. Contudo, a espécie despertou pouco interesse entre os pesquisadores e pecuaristas da época. Dessa forma, o desenvolvimento dos rebanhos ocorreu de forma lenta e localizada, muito provavelmente em razão da impossibilidade do cruzamento com outras espécies de bovídeos e da dificuldade de importação de material genético de outros países. As características fisiológicas, bem como o seu potencial produtivo, foram ignoradas por anos, sendo esse animal criado sob as mesmas premissas de criação dos bovinos. Com o agravante que, devido a maior resistência aparente a patógenos e melhor subsistência em pastagens de pior qualidade, foi relegado às áreas menos férteis das propriedades, impedindo o pleno desenvolvimento das suas características genéticas. Também em razão do desconhecimento, o búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) foi e ainda é, por vezes, confundido com o búfalo africano selvagem (*Syncerus caffer*) ou com o bisão americano (*Bison bison*), também selvagem, recebendo o estigma de serem animais agressivos e de difícil manejo.

A bubalinocultura começou a se desenvolver de fato no Brasil a partir da segunda metade do século XX, ganhando destaque nos últimos anos, com um aumento de mais de 200 mil cabeças nos últimos dez anos (FAOSTAT, 2017). O crescimento no número de adeptos ocorreu principalmente em razão das características organolépticas e nutricionais dos subprodutos leite e carne, que tornam esse produto com maior valor agregado no mercado consumidor, refletindo em maiores ganhos também para o produtor. Aliado ao aumento dos rebanhos estão as buscas por melhorias nos programas de melhoramento genético e reprodutivo da espécie que, se comparado ao de raças bovinas, encontram várias defasagens. As características próprias da espécie devem ser estudadas e respeitadas, procurando protocolos que maximizem o potencial reprodutivo e supram “deficiências” por ora apresentadas.

Reconhecendo a importância do touro como disseminador de genética e o seu grande impacto econômico na fertilidade do rebanho, o grupo de estudos em andrologia da Escola de Veterinária da UFMG tem realizado vários trabalhos, parte dos quais será apresentada nesse trabalho de conclusão de doutorado.

O sêmen da espécie bubalina é considerado de baixa resistência ao processo de congelamento, o que influencia nos baixos índices de fertilidade encontrados nos programas de inseminação artificial. Apenas o conhecimento profundo da composição molecular e bioquímica do plasma seminal e do espermatozoide da espécie, bem como quais e de que forma os fatores externos podem influenciar nessa composição, irão permitir o aprimoramento das técnicas de criopreservação.

O objetivo geral dessa tese foi avaliar as associações da sazonalidade e do clima tropical úmido com as características seminais de búfalos criados em regime extensivo, com suplementação no período de seca. No **capítulo 1** será apresentada uma revisão de alguns pontos relacionados a fisiologia da reprodução masculina, com atenção especial ao espermatozoide de búfalos. A partir do capítulo 2 serão apresentados os experimentos desenvolvidos. No **capítulo 2** foram tomados como referência dois anos de congelamento de sêmen. Dentro desse período foram selecionadas duas épocas para a análise, com base nas variáveis climáticas da região: inverno e verão. Os resultados apontaram para a existência de um efeito da época de coleta sobre as características seminais após o descongelamento, porém mostrando interação dos fatores ano e época de coleta. Com base nos resultados do capítulo 2, optou-se por fazer uma análise mais detalhada das associações externas dentro de um ano de coleta de sêmen, mantendo-se as duas épocas para

análise. Por isso, no **capítulo 3** buscou-se identificar se existiriam variações do perfil proteico do plasma seminal de búfalos em razão da época de coleta, utilizando o SDS-PAGE 1D. Uma vez tendo-se comprovado a variação do perfil de expressão de proteínas, no **capítulo 4** uma técnica mais complexa de separação de proteínas, 2D SDS-PAGE, foi adotada em conjunto com a identificação das proteínas diferencialmente expressas entre as estações de coleta do sêmen, pela técnica de espectrometria de massas. Também no capítulo 4 foi possível a descrição do proteoma principal do plasma seminal de búfalos, o qual ainda não havia sido descrito na literatura. Buscou-se associar funcionalmente as variações de expressão de proteínas encontradas no plasma seminal com características seminais após o descongelamento, com base na literatura disponível.

CAPÍTULO 1 – Revisão de literatura

1. Aspectos na espermatogênese de búfalos

A espermatogênese em mamíferos é um processo complexo e altamente sofisticado responsável pela produção contínua de gametas masculinos. A sequência de eventos que resulta na produção dos espermatozoides ocorre nos túbulos seminíferos, que são compostos essencialmente por células de Sertoli, células germinativas em diferentes graus de diferenciação e células mióides peritubulares. Em geral os túbulos seminíferos ocupam de 60 a 80% do volume testicular total, correspondendo a aproximadamente 82% do parênquima testicular em búfalos (Pawar e Wrobel, 1991a). O compartimento intersticial, que compõe o restante do parênquima testicular, é composto por células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células do sistema imune (França *et al.*, 2005).

Na maioria das espécies mamíferas domésticas, as células de Sertoli apresentam duas fases proliferativas bem marcadas, uma fase pré-natal (células precursoras) e outra pós-natal que continua até próximo à puberdade, quando o número de células é estabilizado. Na espécie bubalina a segunda fase de proliferação e diferenciação das células de Sertoli foi descrita entre nove e dezoito meses de idade, em touros do tipo Rio (Rana e Bilaspuri, 2004). Funções críticas para o sucesso da espermatogênese são atribuídas às células de Sertoli, dentre elas a compartimentalização dos túbulos seminíferos, proporcionando um ambiente imunologicamente privilegiado adequado a cada tipo celular; secreção de fluido, proteínas e fatores de crescimento; fagocitose de células em degeneração. São também essas células as responsáveis por dar suporte e nutrição a todos os estágios das células germinativas em desenvolvimento, tendo, entretanto, capacidade de suporte individual limitada. Essa capacidade de suporte varia de acordo com a espécie (França *et al.*, 2005). Em cortes histológicos de testículo de búfalos maduros, a cada célula de Sertoli foi encontrado de 6 a 7 espermátides, em média (Pawar e Wrobel, 1991b). Em função dessa relação número de células *versus* capacidade de suporte, a proporção de células de Sertoli no túbulo seminífero do animal adulto é usado como um indicador da capacidade de produção de espermatozoides diária da espécie. Os búfalos são incluídos no grupo de animais com média eficiência espermatogênica, produzindo em torno de 13 milhões de espermatozoides por grama de testículo por dia (Da Luz *et al.*, 2012), apresentando de 30 a 40% de células de Sertoli, em relação ao total de células do túbulo seminífero (Pawar e Wrobel, 1991b).

Nas espécies mamíferas a espermatogênese ocorre de forma similar e é dividida em três fases. A primeira fase, denominada proliferativa ou espermatocitogênica, é caracterizada por múltiplas divisões mitóticas das espermatogônias. Na segunda fase, ou fase da meiose, são produzidas as espermátides haploides, resultantes de uma recombinação gênica ocorrida nos espermatócitos

primários. Por fim, na fase final da espermatogênese, conhecida com espermiogênese, as espermatídes são convertidas em espermatozoides através de uma série de modificações, como condensação nuclear, formação do acrosoma e diferenciação das peças intermediária e principal. As maiores perdas celulares por apoptose ocorrem durante a primeira e segunda fases. Em búfalos uma perda de até 63% do número total de células esperadas ao fim do processo foi descrita nessas mesmas fases (Pawar e Wrobel, 1991a).

Como em todos os outros mamíferos, as células germinativas em búfalos formam arranjos de tipos celulares específicos, ao longo de seções do epitélio seminífero. Esses arranjos permitem a identificação de oito estágios que formam um ciclo do epitélio seminífero (Pawar e Wrobel, 1991a). A duração do ciclo do epitélio seminífero em búfalos é de aproximadamente 8,6 dias, o que resulta em uma espermatogênese de 38,7 dias, considerando-se 4,5 ciclos para uma espermatogênese completa (Sharma e Gupta, 1980). Em relação aos grandes mamíferos domésticos esse é um ciclo considerado curto, sendo similar ao do suíno (França *et al.*, 2005).

Todo esse intrincado processo de proliferação e diferenciação celular é controlado por fatores autócrinos, endócrinos, parácrinos e sinalização contato-dependente, que são resultado de ativação/repressão de vários genes e proteínas, que são por vezes específicos do ambiente testicular (revisado por Chocu *et al.*, 2012). É sobre os mecanismos de regulação da espermatogênese, sobretudo aqueles envolvendo a comunicação entre células germinativas e células de Sertoli, que os estudos têm se pautado, empregando ferramentas moleculares como a genômica, a transcriptômica e a proteômica (Com *et al.*, 2014). Esses estudos geraram um grande banco de dados de proteínas potencialmente importantes para a função testicular. Porém as informações sobre a importância dessas proteínas em cada estágio da espermatogênese ainda são uma questão em aberto, bem como a participação de cada uma delas no processo espermatogênico (Chocu *et al.*, 2012).

Com o objetivo de obter informações sobre a secreção diferenciada de proteínas durante a espermatogênese, ao longo da vida dos animais, Huang *et al.* (2016) e Zhang *et al.* (2017) apresentaram os perfis proteicos dos túbulos seminíferos de búfalos do tipo Pântano em diferentes idades: pré-púberes (6-10 meses), púberes (2-3,5 anos) e maduros sexualmente (8-10 anos). Os autores identificaram, respectivamente, 304 e 13 proteínas diferencialmente expressas durante o curso do desenvolvimento. As proteínas identificadas foram envolvidas em processos de desenvolvimento celular, diferenciação, espermatogênese e processos apoptóticos, de acordo com sua ontologia gênica. Ambos os estudos apontam para a necessidade de outras investigações para esclarecer a participação das proteínas identificadas nos processos de diferenciação celular (Huang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Ressalta-se que a diferença quanto ao número de proteínas encontradas se deve principalmente à metodologia de identificação empregada, sendo que Huang *et al.* (2016) utilizaram “*tandem mass tag*” e Zhang *et al.* (2017) empregaram a técnica de separação por eletroforese 2D, seguidas de identificação em espectrômetro de massas.

2. Maturação espermática

Os epidídimos são órgãos tubulares, altamente convolutos, e com composição celular do epitélio heterogênea. De acordo com a distribuição celular ao longo do ducto, e consequentemente dos eventos que ocorrem em cada segmento, o epidídimo é comumente dividido em três segmentos. O segmento inicial e a cabeça, onde se encontram sobretudo células apicais e estreitas, estão principalmente relacionados à absorção de fluidos de origem testicular via trocas iônicas e acidificação do meio. A função desse segmento foi confirmada na espécie bubalina através de

estudos imunohistoquímicos, que demonstraram a intensa expressão das proteínas enzima conversora de angiotensina (ACE) e S-100, envolvidas em processos absorptivos (Alkafafy *et al.*, 2011).

O maior segmento do epidídimo em comprimento, o corpo é onde ocorrem os principais eventos da maturação espermática com intensa atividade secretória pelas chamadas células principais, quer seja por via apócrina (liberação dos chamados epididimossomos) ou via merócrina (via exocitose). Essas células representam de 65-80% de todas as células do epidídimo e sua estrutura e tipo de secreção variam de acordo com sua localização ao longo do ducto epididimário (Robaire e Orgebin-Crist, 2006). A identificação de proteínas como a galactosiltransferase nessas células, por meio de marcação imunohistoquímica de fragmentos de epidídimo de búfalos, reafirma o papel na síntese de glicoproteínas que poderão compor a membrana do espermatozoide em trânsito (Alkafafy *et al.*, 2011).

Por fim o segmento da cauda, constituído principalmente pelas células claras e células basais, cumpre o papel de armazenamento dos espermatozoides e remoção de células anormais e restos citoplasmáticos (Oliva *et al.*, 2009).

As funções do epitélio epididimário são coordenadas por hormônios esteroidais de origem testicular ou local, sobretudo os hormônios 5-alfa-dihidrotestosterona e estradiol. O padrão diferencial de expressão dos receptores hormonais ao longo do ducto epididimário contribui para a marcada segmentação da expressão gênica, característica desse órgão, que resulta nas diferentes funções desempenhadas em cada região (Oliva *et al.*, 2009; Joseph *et al.*, 2011).

O processo de maturação espermática nas espécies mamíferas envolve uma série de eventos que ocorrem durante o trânsito epididimário, que proporcionam modificações estruturais, bioquímicas e mecânicas aos espermatozoides imaturos provenientes dos testículos. Essas modificações culminam em espermatozoides funcionais e aptos a fertilização. O processo não envolve modificações genéticas e sim interações das células com o fluido epididimário. Na espécie bubalina, o trânsito epididimário dos espermatozoides tem uma duração aproximada de 9,3 dias (consolidado da literatura por França *et al.*, 2005).

A principal modificação morfológica sofrida pelo espermatozoide em maturação é o deslocamento da chamada gota citoplasmática da região proximal para a região distal da peça intermediária, ao longo de sua passagem pelo epidídimo. Os mecanismos exatos que coordenam essa transição não são ainda bem descritos, porém sabe-se que esse fenômeno ocorre no segmento de maior concentração espermática e proteica no lúmen do ducto (Dacheux e Dacheux, 2014).

Em relação a modificação da composição da membrana plasmática do espermatozoide, que o prepara para se tornar apto a capacitação e fertilização, percebe-se uma alteração da proporção de fosfolípedes e glicoproteínas em relação a concentração de colesterol (Oliva *et al.*, 2009). A razão entre esses componentes na membrana plasmática irá determinar a capacidade de resposta aos componentes do fluido do trato reprodutor da fêmea, e determina a resistência aos processos de armazenamento do sêmen (Manjunath, 2012).

Apenas o espermatozoide maduro, encontrado na cauda do epidídimo, apresenta o potencial para motilidade progressiva. Essa habilidade é adquirida ao longo da trajetória epididimária por mecanismos não totalmente elucidados, mas que envolvem o aumento intracelular de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e cálcio, bem como pela fosforilação de proteínas específicas (Dacheux e Dacheux, 2014).

3. Puberdade e maturidade sexual

O conhecimento da idade a puberdade e maturidade sexual é ferramenta essencial para os programas de seleção genética, com consequente avanço zootécnico da espécie. Entretanto, essas características são muitas vezes afetadas não só por fatores genéticos, mas também pelo regime nutricional e manejo a que o animal é submetido desde o nascimento. Como resultado dessas variáveis externas, o que se observa na literatura é uma grande diversidade de referenciais para idade a puberdade e maturidade sexual para a espécie bubalina, sobretudo no que se refere ao macho (Henry *et al.*, 2017). Um senso comum é que aparentemente o touro bubalino atinge a puberdade mais tardiamente que o touro bovino, principalmente quando se comparam com raças europeias (Ohashi *et al.*, 2007).

Existem diferentes formas de se definir um animal púbere. Quando se realiza o acompanhamento do animal desde o nascimento em regime de coleta de sêmen, ele se tornará púbere quando em seu ejaculado forem encontrados mais de 50 milhões de espermatozoides totais e com uma motilidade progressiva maior que 10% (Wolf *et al.*, 1965). Seguindo essa metodologia, touros bubalinos do tipo Rio (2n=50) atingiram a puberdade com, em média, 22 meses de idade, pesando acima de 335 kg (Ahmad *et al.*, 1989). Nesse estudo foi possível observar um pico na concentração de testosterona previamente a obtenção de um ejaculado dentro dos padrões.

Outra forma para se identificar idade a puberdade é a partir da análise de cortes histológicos do testículo, quer seja pelo estabelecimento da espermiogênese ou pelo cálculo da produção espermática diária por grama de parênquima testicular. O aparecimento dos primeiros espermatozoides no lume tubular de testículos de búfalos do tipo Rio (2n=50) ocorreu entre 13 a 18 meses de idade (Barreto Filho *et al.*, 1996; Melo *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 2010). Indivíduos mais tardios foram estudados por Mccooll *et al.* (1989), porém cabe ressaltar que esses animais eram representantes de búfalos do tipo Pântano (2n=48). Nesse estudo a puberdade foi estabelecida quando da produção espermática diária por grama de testículo mínima de 500 mil, o que ocorreu por volta de 24 meses de idade, com peso corporal acima de 135 kg.

Um indivíduo é dito maduro sexualmente quando manifesta as seguintes características: quadro espermático estável, redução da taxa de crescimento testicular, características sexuais secundárias plenamente expressas e máximo potencial de libido (Henry *et al.*, 2017). A faixa etária mais frequentemente descrita na literatura para a maturidade sexual no touro bubalino do tipo Rio é de 22 a 24 meses (Vale *et al.*, 2008), e para búfalos do tipo Pântano é a partir de 30 meses (Mccooll *et al.*, 1989).

4. Sazonalidade reprodutiva no macho bubalino

O búfalo é uma espécie considerada poliestrá, que se reproduz ao longo de todo o ano em regiões tropicais. Porém, com a distância do equador eles podem mostrar um padrão de sazonalidade reprodutiva relacionada ao fotoperíodo. Em geral, a atividade reprodutiva dos búfalos será então determinada pela duração do dia (dias curtos); pelas condições climáticas, sobretudo temperatura ambiente e umidade relativa do ar; e pela nutrição (Vale, 2007).

Em regiões em que se encontram marcadas diferenças na razão escuro/luz, ou seja, regiões de clima temperado principalmente, o comportamento reprodutivo dos búfalos tende a se tornar altamente influenciado pela liberação circadiana de melatonina (Perera, 2011). Os estudos envolvendo mecanismos endócrinos de regulação do fotoperíodo tem sido melhor descritos em fêmeas bubalinas (Di Francesco, 2010).

A melatonina é produzida e secretada pela glândula pineal durante a noite. Portanto no inverno, devido aos dias mais curtos, foram observadas as maiores concentrações plasmáticas e maior persistência de pico de melatonina, tanto em novilhas quanto em vacas bubalinas, coincidindo com a reativação da atividade endócrina do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Borghese, 2005). A melatonina parece agir sobre sítios hipotalâmicos específicos aumentando a secreção pulsátil de GnRH, através de um efeito de feedback negativo sobre o estrógeno, o que evita a redução da secreção de hormônio luteinizante (Ramadan, 2017). Protocolos hormonais que incluem a colocação de um implante de liberação lenta de melatonina conseguiram induzir o retorno da atividade ovariana, mesmo em búfalas em anestro de verão (Ramadan, 2017). Esses achados reforçam a provável ação direta desse hormônio sobre a secreção de GnRH e gonadotropinas. Contudo, em touros os estudos disponíveis são ainda inconsistentes em demonstrar um perfil cíclico nas concentrações de melatonina e de testosterona séricas (Brown *et al.*, 1991; Malfatti *et al.*, 2006).

Outro estudo aponta para o envolvimento do neurotransmissor kisspeptina no mecanismo de ação endócrina da melatonina. A melatonina modularia a ação do Kiss-1, neurônio responsável pela secreção da kisspeptina, que apresenta receptores para estradiol e progesterona. A presença desses receptores em Kiss-1 sugere o envolvimento em mecanismos de feedback positivo ou negativo sobre a secreção de GnRH. Esse mecanismo indireto da ação da melatonina foi sugerido em modelo animal ovino, que também possui comportamento sazonal de dias curtos (Smith *et al.*, 2007).

Nos ambientes da zona equatorial, onde a razão luz/escuro é mais ou menos constante ao longo do ano e não há efeito significativo do fotoperíodo, as principais influências sobre a reprodução são o estresse provocado pelo calor e alta umidade e a disponibilidade de alimento. Em países como o Brasil, em que a maior parte do rebanho é criado sob regime extensivo, a disponibilidade de alimento está condicionada ao ciclo anual de chuvas (Vale, 2007).

A espécie bubalina é dita como altamente susceptível aos efeitos ao estresse por calor, especialmente quando exposto a radiação solar direta, em razão da baixa capacidade evaporativa (baixa densidade de glândulas sudoríparas), espessura da pele e escassez de pelos (Marai e Haeeb, 2010). Contudo, estudo realizado em condições tropicais na região Norte do Brasil (1°18'03''S, 47°56'51''O), apontam para uma eficiente capacidade de ativação dos mecanismos de termólise para manter a homeostasia corporal, mesmo em condições climáticas consideradas estressantes (Barros *et al.*, 2015). Nesse estudo, apesar de não terem sido encontradas mudanças hematológicas ou de qualidade seminal em relação às estações do ano, as fortes e significativas correlações apresentadas entre os índices de conforto térmico e características espermáticas, como a integridade de membrana plasmática, reforçam a necessidade de atenção no manejo com os touros doadores de sêmen (Barros *et al.*, 2015).

Condições climáticas estressantes, influenciam a atividade da glândula tireoide, resultando em queda na secreção de hormônios tireoidianos. Sob essas condições, em búfalos, foi observada queda sobretudo do hormônio tri-iodotironina (T3) (Mayahi *et al.*, 2014). O hipotireoidismo exerce efeito de feedback positivo sobre a secreção do hormônio tireoestimulante (TSH) e então sobre a liberação de hormônio liberador de tireotrofinas (TRH). O TRH promove um aumento da concentração sérica de prolactina, que tem efeito depressor da secreção pulsátil de gonadotrofinas, como o hormônio luteinizante em búfalos, como em outras espécies (Morais *et al.*, 2008; Ramadan, 2017).

Em relação aos machos dos mamíferos domésticos, outra característica essencial afetada pelas altas temperatura e umidade é a termorregulação testicular. É sabido que para uma

espermatogênese normal, os testículos devem estar de 3 a 5°C abaixo da temperatura corporal, caso contrário são desencadeados processos de degeneração dos túbulos seminíferos relacionado, entre outros fatores, ao estresse oxidativo (Sharma *et al.*, 2016). O resultado observado quando a capacidade de termorregulação testicular é superada, é a queda da qualidade seminal, quer seja redução da motilidade espermática, aumento da proporção de células anormais, redução de volume de sêmen, entre outros (Brito *et al.*, 2004).

A capacidade de termorregulação testicular, no entanto, é uma característica relacionada a espécie, a raça, e até mesmo ao indivíduo. Essa capacidade adaptativa pode ser uma das razões da grande variabilidade dos resultados encontrados na literatura para a qualidade do sêmen de búfalos coletados em diferentes épocas do ano e em diferentes latitudes. São encontrados desde resultados que demonstram a manutenção da qualidade dos parâmetros seminais, tanto para o sêmen *in natura* quanto para o pós-descongelado, independentemente da temperatura ambiente (Bahga e Khokar, 1991; Younis *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2017), até aqueles que mostram melhores parâmetros no sêmen coletado no verão (Heuer *et al.*, 1987 - para concentração espermática; Koonjaenak *et al.*, 2007 - para integridade de membrana do espermatozoide; Di Francesco, 2010 - para volume seminal e defeitos espermáticos; Sharma *et al.*, 2014 - para volume seminal e concentração espermática; Sharma *et al.*, 2015 - para motilidade espermática).

Diante o exposto, quando se tem o interesse de explorar comercialmente a produção de sêmen é essencial que se façam estudos na região e com a raça de interesse, para entender o comportamento da qualidade do sêmen ao longo do tempo.

Um adequado balanço entre ingestão de energia e gasto metabólico é essencial para o cumprimento das funções vitais dos organismos. Qualquer desbalanço energético afetará diretamente a reprodução das espécies mamíferas, uma vez que provoca redução da secreção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo (Bronson, 2009). Esse é um mecanismo de defesa utilizado por todos os mamíferos, ou seja, quando há baixa disponibilidade de energia todo o consumo é desviado para as funções vitais do organismo, ficando as funções secundárias como reprodução e crescimento corporal prejudicadas.

Tem sido observado que a concentração sérica de testosterona em touros búfalo aumenta à medida que se incrementam os níveis energéticos da dieta. O resultado é uma melhora de vários dos parâmetros espermáticos tanto do sêmen *in natura* quanto na resposta ao processo de congelamento das células espermáticas (Kumar *et al.*, 2017).

A introdução de aditivos na dieta de touros, além de ajudar na manutenção de um balanço energético positivo, pode também influenciar na composição do plasma seminal e da membrana plasmática do espermatozoide, melhorando os parâmetros espermáticos. Por exemplo, a inclusão de ácidos graxos poli-insaturados à dieta de touros Murrah, mantidos em regime de coleta de sêmen, resultou em incremento da progressividade dos espermatozoides após o descongelamento (Gonçalves *et al.*, 2014). Ganhos nos parâmetros espermáticos *in vitro*, mesmo que pequenos, podem resultar em aumento significativo nos resultados dos programas de inseminação artificial.

5. Composição do plasma seminal

Regra geral, os componentes do fluido seminal das espécies mamíferas domésticas são originados das secreções das glândulas sexuais acessórias: glândulas ampulares, glândulas vesiculares, glândulas bulbo-uretrais (glândulas de Cowper) e próstata. A presença ou ausência de cada glândula, bem como tamanho e participação na composição do fluido, varia entre espécies. As

secreções produzidas pelos testículos e epidídimos também participam da composição final do fluido seminal ejaculado (Mann, 1974; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2011).

O plasma seminal é composto de íons (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), substratos energéticos (frutose, sorbitol, glicerofosfolina), componentes orgânicos (ácido cítrico, aminoácidos, peptídeos, proteínas de baixo e alto peso molecular, lipídeos, hormônios, citocinas), entre outros (Mann, 1946). A composição química do plasma seminal varia entre espécies, entre machos da mesma espécie e até mesmo entre ejaculados do mesmo macho. Outros fatores que influenciam a composição do fluido são a alimentação, manejo, ação das enzimas e atividade metabólica dos espermatozoides em suspensão (Juyena e Stelletta, 2012).

Uma vez que a composição do plasma seminal é determinada pela secreção de diferentes tecidos, que estão sob controle de diferentes componentes neuroendócrinos, é esperado que a funcionalidade de seus componentes seja diversa, podendo por vezes se contrapor ou agir de forma coordenada (Poiani, 2006). Dessa forma, as funções do plasma seminal sobre os espermatozoides vão desde simples veículo de transporte e fonte nutritiva, até importantes implicações sobre os mecanismos de motilidade progressiva, hipermotilidade, reação acrossômica, defesa contra o ataque imunológico ou ativação do mesmo em pontos específicos do trato reprodutivo da fêmea e interação com o oócito (Poiani, 2006; Juyena e Stelletta, 2012).

5.1. Componentes não proteicos do plasma seminal

A manutenção das condições osmóticas ideais e de tamponamento do pH, alcançados por um correto balanço de íons no plasma seminal, tem importância fundamental, não apenas para viabilidade e qualidade, mas também para a fertilização (Zhou *et al.*, 2015). Além disso, a disponibilidade de substratos energéticos prontamente consumíveis pelos espermatozoides determina a intensidade e longevidade da sobrevivência espermática.

O plasma seminal será também fonte de componentes lipídicos para reposição e manutenção da estabilidade das membranas plasmáticas dos espermatozoides em suspensão (Aurich *et al.*, 1996). Os lipídeos são apontados como fontes alternativas de energia metabolizável para a célula espermática (Scott e Dawson, 1968).

5.1.1 Minerais

Os minerais são essenciais para o desenvolvimento das funções biológicas vitais. Nas células eles estão envolvidos não só no estabelecimento da pressão osmótica, mas também como catalizadores de várias reações bioquímicas (Wong *et al.*, 2001).

O sódio é o principal cátion presente no plasma seminal, a exceção do bovino que possui maiores concentrações de cálcio (Setchell e Brooks, 1988 citado por Juyena e Stelletta, 2012). O sódio entra na célula através de um canal voltagem dependente e receptor dependente, as chamadas bombas de sódio e potássio ATPase. Dessa forma ele age mantendo o potencial da membrana plasmática, o que é essencial para a viabilidade e correto funcionamento das células vivas (Skandhan e Mazumdar, 1981). O aumento de sódio intracelular provocaria um aumento do pH, induzindo o efluxo de íons hidrogênio, participando assim da ativação dos canais de cálcio da membrana, com consequente influxo de cálcio, sendo então essencial para a motilidade espermática, a capacitação espermática e a reação acrosomal (Skandhan e Mazumdar, 1981; Fraser *et al.*, 1993). Em plasma seminal de búfalos as concentrações de sódio variam de 106,46 até 278 mg/100mL, sendo que concentrações maiores foram encontradas em estações mais frias (Singh, *et al.*, 1969; Sansone *et al.*, 2000; Shukla *et al.*, 2009).

O cálcio é considerado um regulador da fisiologia espermática, e apresenta grandes concentrações nas secreções da próstata, da glândula vesicular e do epidídimo (Wong *et al.*, 2001). Ele está envolvido nos eventos de reação acrosomal dos espermatozoides de mamíferos, além de coparticipar das reações que proporcionam a motilidade espermática (Wong *et al.*, 2001). O cálcio também age estimulando a esteroidogênese nas células de Leydig do testículo (Perumal *et al.*, 2015). No plasma seminal de búfalos são reportados valores entre 22,36 até 44,95 mg/100mL (Singh *et al.*, 1969; Sansone *et al.*, 2000; Shukla *et al.*, 2009; Eghbali *et al.*, 2010). Nessa espécie as concentrações de cálcio no plasma seminal foram alta e positivamente correlacionadas com movimento de massa, motilidade progressiva e viabilidade dos espermatozoides (Eghbali *et al.*, 2010).

O magnésio é um cofator de várias reações enzimáticas que envolvem a produção de ATP e síntese de ácidos nucleicos. Está presente de maneira significativa nas secreções das glândulas vesiculares (Wong *et al.*, 2001). Na célula espermática, o magnésio é um potente estimulador da motilidade espermática, uma vez que participa da ativação da enzima adenilato ciclase, para produção da AMP cíclica (Lapointe *et al.*, 1996). Em estudo com touros bubalinos a concentração de magnésio no plasma seminal foi correlacionada positivamente com o movimento de massa, motilidade progressiva e viabilidade espermáticas (Eghbali *et al.*, 2010). As concentrações no plasma seminal dessa espécie variam de 6,17 a 11,94 mg/100mL (Sansone *et al.*, 2000; Shukla *et al.*, 2009; Eghbali *et al.*, 2010).

O zinco participa das funções testiculares, epididimárias e da próstata, exercendo atividades antioxidante e antibacteriana (Juyena e Stelletta, 2012). Além disso, esse íon parece estar envolvido na inibição do consumo de oxigênio pelo espermatozoide, agindo como acceptor de elétrons (Riffo *et al.*, 1992), e na estabilização da cromatina nuclear, protegendo da oxidação (Hunt *et al.*, 1992). Aparentemente a concentração de zinco no plasma seminal de búfalos diminui com o avançar da idade (Sansone *et al.*, 2000). Os mesmos autores relatam uma concentração média do zinco de 86,88 µmol/L no plasma seminal.

Altas concentrações do íon potássio tem sido relacionadas a um efeito inibitório sobre o consumo de oxigênio, metabolismo da frutose e acúmulo de ácido lático pelo espermatozoide. Esses efeitos causariam prejuízo da qualidade seminal, sobretudo quanto ao armazenamento (Singh *et al.*, 1969). Em contrapartida, maiores concentrações de potássio foram encontradas em amostras com menor percentual de defeitos espermáticos (Shukla *et al.*, 2009). As concentrações de potássio no plasma seminal de búfalos podem variar de 98,18 a 205 mg/100mL (Singh, *et al.*, 1969; Sansone *et al.*, 2000; Shukla *et al.*, 2009).

5.1.2 Açúcares

No plasma seminal de ruminantes a frutose é o principal glicídeo (Mann, 1946). Ela é sintetizada a partir da glicose sérica pelas glândulas genitais acessórias, em especial as glândulas vesiculares estimuladas pela testosterona (Kumar e Farook, 1994). O metabolismo da frutose no sêmen depende de vários fatores, tais como a concentração inicial no plasma seminal, a concentração espermática, pH e temperatura (Mann, 1946). As concentrações de frutose no sêmen de búfalos são menores comparativamente à de bovinos, variando entre 623 a 817,54 mg/100mL, essa diferença pode influenciar negativamente na longevidade espermática dessa espécie (Barnabe *et al.*, 1993; Sansone *et al.*, 2000).

Os espermatozoides normalmente utilizam a frutose, que está prontamente disponível no plasma seminal, porém ele também é capaz de metabolizar eficientemente glicose e manose (Mann, 1946). Outros açúcares reduzidos, como o sorbitol, são encontrados no plasma seminal de ruminantes. Os espermatozoides de ovinos possuem atividade da enzima sorbitol desidrogenase, capaz de converter sorbitol a frutose (Georgiev, 1974).

5.1.3 Lipídeos

O plasma seminal contém colesterol, fosfolípidios e di e tri-glicerídeos. As possíveis fontes desses compostos são os epidídimos e sobretudo os espermatozoides danificados e que sofreram morte celular (Juyena e Stelletta, 2012).

Quanto a composição percentual de fosfolípidios, o plasma seminal de suínos e humanos possuem maiores concentrações de esfingomielinas; já em ruminantes a fosfatidilcolina representa quase metade de toda a composição lipídica do plasma. Essa variação no perfil lipídico deve refletir a composição da membrana plasmática dos espermatozoides, e influenciar na estabilidade da membrana a variações de temperatura (Am-In *et al.*, 2011).

O colesterol presente na membrana plasmática dos espermatozoides está envolvido nos processos de capacitação e reação acrosomal, que são cruciais para a fertilização. Dessa forma, se consideramos o plasma seminal como fonte de colesterol para a membrana plasmática, uma menor concentração estará relacionada a subfertilidade ou à menor resistência aos processos de criopreservação (Beer-Ljubić *et al.*, 2009).

A concentração média de colesterol HDL e LDL no plasma seminal de búfalos, 16,04 mg/dL e 43,09 mg/dL respectivamente, foi menor comparativamente àquela de raças de bovinos europeus, de 25,09 a 33,49 mg/dL e 63,13 a 66,73 mg/dL respectivamente (Nikan *et al.*, 2005). Considerando o fato já conhecido de que o processo de resfriamento/congelamento dos espermatozoides reduz a composição de colesterol da membrana plasmática (Kadirvel *et al.*, 2009) e propondo o plasma seminal como fonte de reposição, a menor concentração inicial de colesterol no sêmen de búfalos pode ser um dos fatores responsáveis pela baixa qualidade seminal obtida após o descongelamento (Andrabi, 2009).

5.2 Componentes proteicos do plasma seminal

Existem evidências de que as proteínas do plasma seminal, dentre outros componentes, são adsorvidas na membrana do espermatozoide em diferentes momentos, desde a ejaculação até o encontro com o oócito (Duncan e Thompson, 2007; Moura e Memili, 2016). Muitas dessas proteínas são associadas a processos ligados à viabilidade espermática como a manutenção da integridade da membrana, motilidade, capacitação espermática, reação acrosomal, interação entre gametas e fertilização (Juyena e Stelletta, 2012; Moura e Memili, 2016).

O plasma seminal contém uma grande diversidade de proteínas. Não se sabe quantas proteínas são expressas no plasma seminal das diversas espécies mamíferas, porém estima-se que mais de 10.000 proteínas possam estar expressas nesse fluido em humanos, incluindo as isoformas (Gilany *et al.*, 2015). O estudo do proteoma do plasma seminal é então complexo uma vez que existe grande variação na concentração de proteínas dentro de uma espécie e mais ainda entre espécies (Batrukh *et al.*, 2011; Druart *et al.*, 2013; Gilany *et al.*, 2015). O conhecimento profundo da expressão das proteínas no líquido seminal permitirá a identificação de biomarcadores associados

a patologias reprodutivas ou maior potencial de fertilidade dos espermatozoides, bem como à maior resistência espermática ao processo de criopreservação.

Uma família de proteínas altamente conservada no plasma seminal de mamíferos, denominada proteínas de ligação ao espermatozoide (*Binder of Sperm proteins – BSP*), é a mais estudada desde sua primeira identificação em plasma seminal de bovino, ocorrida na década de 80 (revisado por Plante *et al.*, 2016). De forma geral, são proteínas conhecidas por sua capacidade de ligação à fosfolípidos, gelatina e heparina estando, portanto, envolvidas na destabilização da membrana plasmática e capacitação dos espermatozoides (Manjunath e Thérien, 2002).

As proteínas da família das BSP têm sido envolvidas em uma série de eventos que acompanham a preparação dos espermatozoides para a fertilização. Seu envolvimento no processo de capacitação espermática é o mais estudado, porém outras funções relacionadas à motilidade espermática, formação do reservatório espermático na tuba uterina, entre outros tem sido descrita ao longo dos anos (Plante *et al.*, 2016). Além dos mecanismos fisiológicos, as BSP, devido a suas ações biológicas, têm envolvimento prejudicial nos processos de preservação *ex situ* das células espermáticas por longos períodos, quer seja na forma líquida ou congelada (Manjunath *et al.*, 2002).

Quanto à regulação hormonal da expressão das proteínas BSP, evidências sugerem que haja forte dependência de andrógenos (Plante *et al.*, 2016). Entretanto, outros fatores podem estar envolvidos, visto que algumas espécies após a castração, mesmo sob suplementação exógena de testosterona, não restabelecem a expressão ótima dos genes de produção de BSP1 (*REP52*) (coelhos) (Nixon *et al.*, 2008).

Em bovinos três tipos de proteínas BSP, de origem das glândulas vesiculares, foram melhor caracterizadas, e representam 40-57% do total da fração proteica do plasma seminal: BSP1, BSP3 e BSP5 (Nauc e Manjunath, 2000). Dentre as BSPs a proteína BSP1 é a mais expressa tanto no plasma seminal quanto ligada ao espermatozoide ejaculado em bovinos, constituindo 25-47% do total de proteínas expressas no plasma seminal e 2,5-4% das proteínas expressas no espermatozoide. Como resultado, a razão entre as três proteínas no plasma seminal é dita 10:1:1, sendo BSP1, BSP3 e BSP5 respectivamente, no plasma seminal bovino (Nauc e Manjunath, 2000).

Quando as proteínas do plasma seminal de bubalinos foram pesquisadas para a presença de homólogos das proteínas BSP bovinas, foram encontradas correspondências para as proteínas BSP1, BSP3 e BSP5. A correspondência da BSP1 foi confirmada pela similaridade do peso molecular, 14,3 kDa, e pela reação cruzada dos anticorpos anti-BSP1 bovina purificados (Harshan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2014). A proteína BSP3 foi predita a partir da análise da sequência de nucleotídeos do gene BSP3 de búfalos. Essa última proteína possui 136 aminoácidos, sendo 8 resíduos de cisteína, peso molecular teórico de 15,8 kDa e ponto isoeletrico de 5,34 (Kutty *et al.*, 2017). Por imunomarcção, utilizando anti-corpos anti-BSP5 bovina, a expressão de BSP5 foi confirmada em plasma seminal de búfalos, porém com aparente menor concentração quando comparada ao bovino. Grande quantidade de BSP5 ligada à peça intermediária do espermatozoide ejaculado também foi relatada (Divyashree e Roy, 2018).

A suspeita da presença de proteínas estruturalmente similares ao grupo das BSP, ou seja, que possuem domínios Fn II e que apresentam, portanto, afinidade à heparina e gelatina, no plasma seminal de búfalos havia sido demonstrada em estudo anterior (Arangasamy *et al.*, 2005). Fato curioso é a baixa predominância desse grupo de proteínas identificados por Arangasamy *et al.* (2005), que demonstram que apenas 9,7% das proteínas totais do plasma seminal de búfalos

apresentaram esse comportamento, muito inferiores aos percentuais descritos para outras espécies de ruminantes (Nauc e Manjunath, 2000). A baixa concentração de proteínas no plasma seminal de búfalos, em relação ao de bovinos, pode estar relacionada à menor concentração sérica de testosterona (Ohashi *et al.*, 2007).

Além disso, uma inversão da razão de predominância dos tipos de BSP no plasma seminal de búfalos foi relatada por Shende *et al.* (2015). A expressão de proteínas BSP3 foi maior em relação aos outros dois tipos de BSP, sendo a razão proposta de 10:18:1, para BSP1, BSP3 e BSP5 respectivamente. A repercussão funcional para o espermatozoide dessa mudança no padrão de expressão das BSPs e, conseqüentemente, fertilidade e resistência ao congelamento, necessita de estudos mais profundos.

Outra proteína identificada em plasma seminal de búfalos é a osteopontina (Pero *et al.*, 2007). Conhecida como proteína associada a fertilidade (Moura *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2017), a osteopontina possui peso molecular de 55 kDa (variação 25-80 kDa), com aproximadamente 278-305 resíduos de aminoácidos, de caráter ácido, ponto isoelétrico 4,5 (associado à presença de ácido aspártico/aspartato, ácido glutâmico e serina) e glicosilada (Cancel *et al.*, 1997).

A concentração de osteopontina no plasma seminal de búfalos considerados férteis (18,97 pg/mL) é muito maior que naquele de touros subférteis (7,45 pg/mL), resultando em melhores parâmetros de motilidade espermática após o descongelamento (Kumar *et al.*, 2017). Essas observações provavelmente têm relação com a capacidade de ligação das osteopontinas ao espermatozoide ejaculado, modulando as concentrações de cálcio intracelular (Souza *et al.*, 2008).

O peptídeo tuberoinfundibular (TIP39) é um neuropeptídeo comumente associado a espermatogênese, porém foi também identificado no plasma seminal de búfalos. Esse peptídeo foi apresentado como outro potencial marcador de congelabilidade do plasma, uma vez que sua concentração foi correlacionada a integridade da cromatina, menor reação acrosomal e maior motilidade espermáticas após o descongelamento (Selvaraju *et al.*, 2016). Também conhecido como hormônio paratireoideo 2, esse peptídeo atua em seus receptores presentes na membrana do espermatozoide, ativando a enzima adenil ciclase (Selvaraju *et al.*, 2016).

Mudanças no padrão de expressão de proteínas no plasma seminal em razão de mudanças climáticas/estação do ano, foram observadas em touros búfalo criados na Índia. Em razão de serem ainda poucos os estudos com esse foco, não há um consenso de quais proteínas estariam envolvidas nessa flutuação. As proteínas fosfoglicerato quinase, proteína reguladora de andrógeno, inibidor de ribonuclease e sorbitol desidrogenase são as proteínas identificadas com maior expressão em plasma seminal coletado no inverno (Nandre *et al.*, 2013). Os demais estudos disponíveis não realizaram a identificação de proteínas, porém sugerem diferenças no perfil eletroforético dependendo da estação do ano em que as amostras foram coletadas (Sharma *et al.*, 2014, 2015, 2016).

CAPÍTULO 2 – Associação da sazonalidade com a congelabilidade do sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados em clima tropical úmido

1. Introdução

A climatologia tem sido objeto de estudo, considerando que a produtividade animal é primariamente determinada pelos efeitos diretos dos componentes climáticos sobre a fisiologia animal além de ser, em grande parte, baseada na disponibilidade dos recursos naturais. Pesquisa desenvolvida em ambientes controlados mostra que a duração e intensidade do estresse provocado pelas adversidades do clima influenciam as respostas orgânicas dos animais bem como a reversibilidade do quadro (Bhakat *et al.*, 2015).

Em locais onde há predomínio do regime de criação extensivo, a disponibilidade de alimento, isto é, de volumoso de alta qualidade e em quantidade, são condicionados pela distribuição de chuvas na região (Pezzopane *et al.*, 2015). A restrição na ingestão de energia e proteína na dieta resulta em efeitos adversos na secreção de andrógenos (Kumar *et al.*, 2017), resultando em uma deficiência funcional das glândulas acessórias. O mecanismo endócrino proposto em ovinos envolve tanto a ação dos metabólitos gerados no balanço energético negativo sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, quanto regulação dos mecanismos de feedback (Selvaraju *et al.*, 2012).

Outra característica essencial afetada pelo clima é a termorregulação corporal e testicular. É sabido que para a espermatogênese os testículos devem estar de 3 a 5°C abaixo da temperatura corporal, caso contrário são desencadeados processos de degeneração dos túbulos seminíferos relacionado, entre outros fatores, ao estresse oxidativo (Sharma *et al.*, 2016). O resultado observado quando a capacidade de termorregulação testicular é superada, é a queda da qualidade seminal, quer seja redução da motilidade espermática, aumento da proporção de células anormais, redução de volume de sêmen, entre outros (Brito *et al.*, 2004).

O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) é considerado uma espécie sazonal, apesar de não estar claro se essa é uma característica condicionante pela produção circadiana de melatonina ou o resultado do estresse térmico ou nutricional (Ferrer *et al.*, 2010). Entretanto, os resultados encontrados para qualidade do sêmen de búfalos, quer seja fresco ou após descongelamento, são controversos (Dixit *et al.*, 1984; Heuer *et al.*, 1987; Bahga e Khokar, 1991; Mandal *et al.*, 2003; Koonjaenak *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2015; Bhakat *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2017) e não parecem seguir um padrão estacional fixo. Em comum os pesquisadores atribuem as flutuações encontradas às diferentes raças, intensidade da variação climática das regiões em que cada experimento foi desenvolvido, idade dos animais, tipo de manejo que lhes é atribuído, alimentação e disponibilidade de água.

Assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar a associação entre a sazonalidade e a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos criados em regime extensivo, sob clima tropical úmido. Para cumprir essa proposta, as características cinéticas (CASA), morfológicas (citometria de fluxo) e funcionais (teste hiposmótico) dos espermatozoides descongelados foram comparadas segundo a época de coleta do sêmen.

2. Material e métodos

2.1. Local, período e caracterização climática

O experimento foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura (CBB), localizado em Pedro Leopoldo, MG, Brasil (19°37'04''S, 44°02'34''O, com altitude média de 730 metros). O clima na região é o tropical úmido - *Aw* (Kottek *et al.*, 2006), com pluviosidade média anual histórica de 1320 mm e média anual de temperatura de 21,8°C. O período total do estudo abrangeu dois anos, entre os meses de junho de 2014 a maio de 2016.

Para o monitoramento do padrão climático durante o período experimental as variáveis temperatura máxima, média e mínima diárias, umidade relativa do ar diária e precipitação acumulada mensal, foram obtidas da estação climática do Setor de Estudos Climatológicos do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA), localizado a 5,7 km do local de manejo e criação dos animais (Figura 1). Os dados de temperatura média diária e umidade relativa do ar diária foram utilizados para calcular o índice de temperatura e umidade (ITU), tido como indicador de desconforto térmico dos animais. A equação utilizada foi proposta em Marai *et al.* (2001): $ITU = db^{\circ}C - [(0.31 - 0.31 * RH) * (db^{\circ}C - 14,4)]$, onde $db^{\circ}C$ é a temperatura do bulbo seco em grau Celsius e RH é o percentual de umidade relativa do ar dividido por 100. A interpretação dos valores de ITU obtidos seguiu os seguintes critérios: valores abaixo de 22.2 indicam ausência de estresse térmico, entre 22.2 e 23.3 estresse moderado e entre 23.3 e 25.6 estresse severo, segundo proposto em Marai e Haebe (2010).

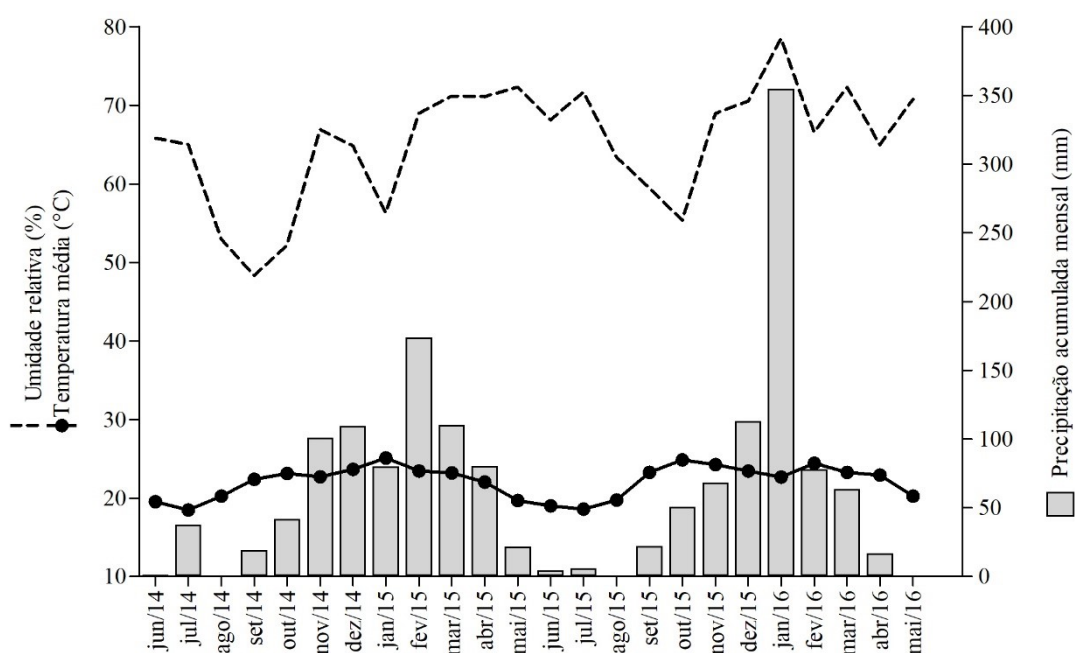


Figura 1. Média mensal das variáveis temperatura média (°C) e umidade relativa do ar (%) e precipitação acumulada mensal (mm), obtidas no período de junho de 2014 a maio de 2016, no Setor de Estudos Climatológicos, do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA).

No hemisfério sul as estações climáticas são definidas por: inverno (20 de junho a 23 de setembro), primavera (23 de setembro a 21 de dezembro), verão (21 de dezembro a 21 de março) e outono (21 de março a 20 de junho). Para a avaliação da qualidade espermática após o descongelamento nesse estudo foram escolhidas as estações de **inverno e verão** (mais contrastantes), sendo as coletas de sêmen incluídas no experimento aquelas realizadas nos dois últimos meses de cada estação, respeitando-se aproximadamente 50 dias após o início delas. Esse

intervalo de tempo foi escolhido buscando-se aproximar do período total da espermatogênese e maturação espermática relatada para a espécie (~ 39 dias e 9.3 dias, respectivamente) objetivando a avaliação do efeito específico da estação (Sharma *et al.*, 2016).

Dessa forma ficam definidos os meses de: agosto e setembro/2014, como inverno do Ano 1; fevereiro e março/2015, como verão do Ano 1; agosto e setembro/2015 como inverno do Ano 2; e fevereiro e março/2016, como verão do Ano 2.

2.2. Animais e processamento do sêmen

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFGM – 129/2014).

Participaram desse estudo um total de nove búfalos Murrah (tipo Rio) adultos (34 ± 8 meses) e clinicamente saudáveis. Os touros foram expostos ao fotoperíodo natural e às condições climáticas da região, estando sob manejo semi-extensivo de criação. Os animais foram mantidos em piquetes coletivos (*Urochloa brizantha* cv Marandu), com suplementação (silagem de sorgo) fornecida uma vez ao dia durante os períodos de seca, tendo acesso a sal mineral e água *ad libitum*.

Os touros foram submetidos a coletas de sêmen semanais pelo método da vagina artificial ($42^\circ - 45^\circ\text{C}$), depois de expostos a uma fêmea bubalina em estro ou não. Para cada touro dois ejaculados em cada estação, em cada ano, foram utilizados para a proposta experimental. Foram utilizados ejaculados que atingiram no mínimo 70% de motilidade progressiva, 3 de vigor espermático e menos de 30% de defeitos espermáticos (CBRA, 2013). No total, 55 ejaculados foram coletados no inverno (n=24) e no verão (n=31).

Os ejaculados foram diluídos a uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides/mL utilizando meio diluidor comercial, a base de gema de ovo centrifugada (BotuBov[®], SP, Brasil). As amostras de sêmen diluídas foram envazadas em palhetas de 0,25 mL, resfriadas a 5°C ($-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$) e mantidas em um tempo de equilíbrio de 4 horas, em máquina computadorizada de resfriamento de sêmen (TK 4000[®], MG, Brasil). As palhetas resfriadas foram colocadas a 5 cm da superfície do nitrogênio líquido por 20 minutos, e então armazenadas em botijão criogênico (-196°C).

2.3. Análises laboratoriais do sêmen após o descongelamento

2.3.1. Cinética espermática medida com CASA

Os parâmetros da cinética espermática foram medidos pelo sistema CASA (SCA[®], v. 4, Microptic, Espanha). Duas palhetas de cada ejaculado foram descongeladas em banho-maria (37°C , 30 s) e reunidas em um microtubo pré-aquecido (37°C). Os pools de amostras foram analisados com o CASA cinco minutos após o descongelamento (0h) e novamente após 120 min (2h) de incubação a 37°C . Para verificar a resistência térmica espermática após descongelamento das amostras de sêmen foi tomado o valor da diferença entre as análises 2h e 0h, representando a queda sofrida durante o período de incubação. Dessa forma, quanto menor a resistência dos espermatozoides da amostra à temperatura/tempo de incubação, maior o valor de queda apresentado.

Para a análise uma alíquota de 5 μL de amostra foi colocado sobre lâmina/lâminula aquecidas, sendo analisadas no mínimo 1000 células em pelo menos cinco campos escolhidos aleatoriamente. Vinte imagens por segundo foram tomadas. Em cada amostra a motilidade

progressiva (MP %), motilidade total (MT %) e móveis com velocidade rápida (Rap %), bem como a velocidade curvilínea (VCL $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL $\mu\text{m/s}$), velocidade média da trajetória (VAP $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN %) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF Hz) foram determinados. Segundo as configurações do sistema, os espermatozoides foram considerados progressivos se a retilinearidade (STR) > 70% e com trajetória circular se LIN < 50%. Espermatozoides apresentando VCL > 50 $\mu\text{m/s}$ foram classificados como velocidade rápida. A área da partícula considerada para leitura foi entre 20 e 70 micrômetros².

2.3.2. Análises de citometria de fluxo

As análises de integridade de membrana plasmática e integridade do DNA espermáticos foram desenvolvidas utilizando o citômetro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson, São José, USA) equipado com 15 mW laser de Argônio, excitando a 488 nm e medindo emissão de 488 a 774 nm de comprimento de onda. Depois da aquisição, os dados foram avaliados no software FlowJo (v.7.6.1, TreeStar Inc, CA, USA).

A integridade estrutural espermática foi analisada empregando-se dois corantes fluorescentes que se ligam ao DNA: o Sybr Green (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA), um corante permeável à membrana plasmática, e o Iodeto de propídio (PI - Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA), um corante convencional para marcação de células mortas. O Sybr Green foi diluído 1:10 em PBS, para a solução de trabalho. Cinco microlitros dessa solução de trabalho foram adicionados à 1 mL de sêmen diluído em PBS a uma concentração final de 4×10^6 espermatozoides/mL. Em sequência, quinze microlitros de solução PI (0.01 mg/mL) foram adicionados à mistura e então incubado por 10 minutos antes da análise. Cada amostra foi analisada por meio da aquisição de 30,000 eventos totais, e o resultado foi expresso em percentual de espermatozoides viáveis (Sybr green⁺/PI).

A integridade da cromatina nuclear foi testada usando o teste de estrutura da cromatina espermática (SCSA) (Evenson e Jost, 2000). Uma amostra de 400.000 espermatozoides foi diluída em 100 μL de tampão TNE (0.01 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) e incubado com 200 μL de solução detergente ácida (0.17% Triton 100X, 0.15 M NaCl, 0.08 N HCl, pH 1.4) por 30 segundos a temperatura ambiente. Então, 1.2 mL da solução final (0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 M ácido cítrico, 0.2 M Na_2HPO_4 , pH 6.0) foi adicionado, seguido imediatamente da adição de 10 μL da solução final do corante Laranja de acridina (0.5 mg/mL). O sinal de 30,000 eventos foi lido depois de 5 minutos de incubação a temperatura ambiente. O índice de fragmentação do DNA (IDF) foi obtido pela razão entre a intensidade da fluorescência vermelha e a fluorescência total (Figura 2).

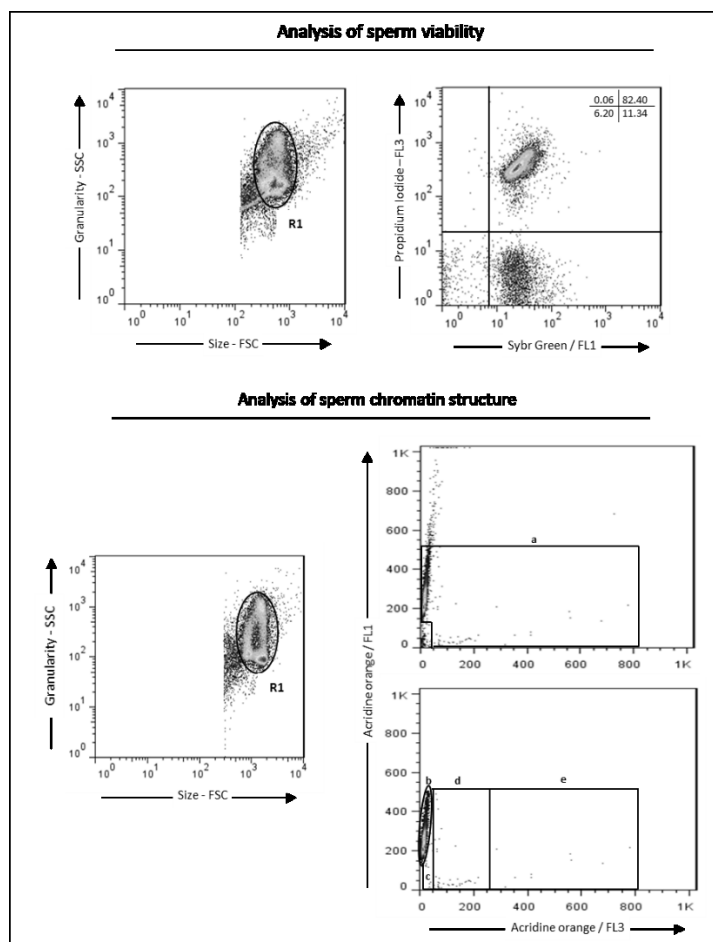


Figura 2. Avaliação dos espermatozoides de búfalos utilizando citometria de fluxo. As análises de integridade estrutural de membrana plasmática, utilizando sonda fluorescente Sybr green (detectada pelo fotodetector FL-1, indicada no eixo X) e sonda fluorescente Iodeto de Propídeo (detectada pelo fotodetector FL-3, indicado no eixo Y). Análise da estrutura da cromatina espermática usando sonda fluorescente Laranja de Acridina, detectada pelo fotodetector FL-3, indicado no eixo X (a – grupo de células principais; b – grupo de DNA não fragmentado; c – grupo de DNA de baixa fragmentação; d – grupo de média fragmentação de DNA; e – grupo de alta fragmentação de DNA; c+d+e – índice de fragmentação total).

2.3.3. Integridade da membrana plasmática – teste hiposmótico

O teste hiposmótico (HOST) foi realizado incubando 50 μL de sêmen com 500 μL de solução hiposmótica (Rasul *et al.*, 2000), a 37°C durante 30 minutos. Duzentos espermatozoides por lâmina foram contados, sob aumento de 1000x, em microscópio de contraste de fase. Espermatozoides com caudas enroladas/reagidas foram considerados positivos ao teste.

2.4. Análise estatística

Inicialmente, as médias dos quadrados mínimos (*LSM*) e os erros-padrão das variáveis seminais mensuradas foram calculados de acordo com o ano (Ano 1 e Ano 2) e a estação de coleta (Inverno e Verão). Na sequência, modelos mistos considerando os efeitos fixos de ano, época e a interação ano *versus* época e os efeitos aleatórios de animal e resíduo foram ajustados aos dados utilizando-

se a metodologia de máxima verossimilhança restrita, por meio do procedimento MIXED do software SAS v.9.

Para ajuste do efeito aleatório de animal, a abordagem de medidas repetidas foi utilizada porque o mesmo indivíduo foi submetido a várias coletas ao longo do período experimental e seus dados podem estar correlacionados por terem sido obtidos na mesma unidade experimental. Então, antes de realizar os testes e hipóteses para os efeitos fixos, a estrutura de (co)variância entre as medidas repetidas em um mesmo animal foi modelada. Foram testadas três estruturas: componentes de variância - VC, caracterizada por variâncias iguais e observações independentes (não há correlação entre as observações ao longo do tempo); auto regressiva de primeira ordem - AR(1), que considera variâncias homogêneas e covariâncias iguais entre qualquer par de medidas; e auto regressiva heterogênea de primeira ordem - ARH(1), caracterizada por variâncias heterogêneas e covariâncias iguais apenas entre medidas consecutivas, com redução exponencial a medida que as medias se distanciam. A estrutura mais adequada foi escolhida considerando os menores valores dos critérios “-2 Residual Log Likelihood” (-2RES), Akaike (AIC), Akaike corrigido (AICC) e Bayesiano (BIC).

Após a definição da melhor estrutura de variância para o efeito animal, o teste de Tukey-Kramer associado aos efeitos de ano, época e interação ano *versus* época foram realizados para cada variável (características seminais) e o critério decisório acerca da significância do efeito foi $\alpha=0,05$.

3. Resultados

Os valores médios dos quadrados mínimos (e erros-padrão) das variáveis meteorológicas observados durante as estações do experimento são apresentados na Tabela 1 (separadas de acordo com o ano e estação). As variações encontradas foram consistentes com o padrão geralmente encontrado para o clima tropical úmido e as médias históricas da região. Para todas as variáveis climáticas observadas e índice de temperatura e umidade calculado, exceto umidade relativa, os dois anos do estudo foram similares entre si. O percentual de umidade relativa do ar foi mais elevado no ano 2 em relação ao ano 1, durante o inverno. Já em relação às estações, nos dois anos, as temperaturas (média e mínima), a precipitação acumulada mensal e o ITU foram maiores durante o verão. Quanto a temperatura máxima apenas no ano 2 houve diferença entre as estações (maior no verão).

Em relação aos parâmetros cinéticos espermáticos imediatamente após o descongelamento (0h), houve uma interação significativa entre o ano e a época de coleta do sêmen, sendo observadas maiores médias dos quadrados mínimos naquelas amostras coletadas no verão e no ano 2. O padrão de linearidade dos espermatozoides (LIN) após o descongelamento não sofreu influência de nenhum dos efeitos fixos estudados (Tabela 2).

Tabela 1. Valores médios dos quadrados mínimos (\pm erro padrão) das variáveis climáticas obtidas no Setor de Estudos Climatológicos do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA) nos períodos de agosto e setembro/2014 (Inverno, Ano 1), fevereiro e março/2015 (Verão, Ano 1), agosto e setembro/2015 (Inverno, Ano 2) e fevereiro e março/2016 (Verão, Ano 2).

Ano	Estação		Média
	Inverno	Verão	
Temperatura máxima (°C)			
Ano 1	27.88 \pm 0.39 ^{aA}	28.28 \pm 0.30 ^{aA}	28.08 \pm 0.25
Ano 2	27.65 \pm 0.45 ^{aA}	28.95 \pm 0.22 ^{bA}	28.29 \pm 0.26
Média	27.93 \pm 0.22	28.29 \pm 0.20	
Temperatura média (°C)			
Ano 1	21.29 \pm 0.31 ^{aA}	23.31 \pm 0.20 ^{bA}	22.28 \pm 0.21
Ano 2	21.46 \pm 0.35 ^{aA}	23.81 \pm 0.15 ^{bA}	22.63 \pm 0.22
Média	22.00 \pm 0.18	22.85 \pm 0.16	
Temperatura mínima (°C)			
Ano 1	15.35 \pm 0.34 ^{aA}	19.35 \pm 0.12 ^{bA}	17.32 \pm 0.26
Ano 2	15.79 \pm 0.32 ^{aA}	19.51 \pm 0.11 ^{bA}	17.64 \pm 0.24
Média	16.80 \pm 0.21	18.20 \pm 0.18	
Umidade relativa do ar (%)			
Ano 1	50.66 \pm 1.07 ^{aA}	70.10 \pm 1.29 ^{bA}	60.22 \pm 1.22
Ano 2	61.43 \pm 1.42 ^{aB}	69.48 \pm 1.07 ^{bA}	65.42 \pm 0.96
Média	60.62 \pm 0.94	66.96 \pm 0.79	
Precipitação acumulada mensal (mm)			
Ano 1	9.80 \pm 9.60 ^{aA}	142.00 \pm 31.75 ^{bA}	75.88 \pm 40.48
Ano 2	11.10 \pm 11.10 ^{aA}	70.75 \pm 7.35 ^{bA}	40.93 \pm 18.06
Média	10.45 \pm 6.00	106.40 \pm 24.48	
Índice de temperatura e umidade (ITU)			
Ano 1	20.21 \pm 0.25 ^{aA}	22.44 \pm 0.15 ^{bA}	21.30 \pm 0.18
Ano 2	20.55 \pm 0.28 ^{aA}	22.89 \pm 0.11 ^{bA}	21.71 \pm 0.18
Média	21.05 \pm 0.15	21.95 \pm 0.14	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0.05$).

Tabela 2. Associação da estação e do ano da coleta do sêmen com as variáveis cinéticas seminais (média dos quadrados mínimos \pm erro padrão) imediatamente após o descongelamento (0h) de touros búfalo criados em clima tropical úmido.

Ano	Época		Média
	Inverno	Verão	
Motilidade progressiva (MP, %)			
Ano1	27.53 \pm 3.85 ^{aA}	11.51 \pm 3.10 ^{aA}	19.52 \pm 2.53
Ano2	12.36 \pm 3.21 ^{aA}	53.19 \pm 3.03 ^{bB}	32.78 \pm 2.28
Média	19.94 \pm 2.51	32.35 \pm 2.17	
Motilidade total (MT, %)			
Ano1	47.34 \pm 5.77 ^{aA}	29.61 \pm 4.66 ^{aA}	38.48 \pm 3.88
Ano2	25.37 \pm 4.83 ^{aA}	80.20 \pm 4.59 ^{bB}	52.79 \pm 3.52
Média	36.36 \pm 3.77	54.90 \pm 3.28	
Velocidade rápida (Rap, %)			
Ano1	22.43 \pm 4.03 ^{aA}	8.26 \pm 3.24 ^{aA}	15.35 \pm 2.64
Ano2	10.28 \pm 3.35 ^{aA}	51.92 \pm 3.16 ^{bB}	31.11 \pm 2.37
Média	16.36 \pm 2.62	30.09 \pm 2.26	
Velocidade curvilínea (VCL, μ m/seg)			
Ano1	45.27 \pm 4.05 ^{aA}	31.64 \pm 3.25 ^{aA}	38.46 \pm 2.64
Ano2	41.55 \pm 3.36 ^{aA}	66.12 \pm 3.16 ^{bB}	53.84 \pm 2.36
Média	43.41 \pm 2.63	48.88 \pm 2.27	
Velocidade linear progressiva (VSL, μ m/seg)			
Ano1	29.20 \pm 2.71 ^{aA}	18.00 \pm 2.17 ^{aA}	23.60 \pm 1.75
Ano2	23.16 \pm 2.25 ^{aA}	44.27 \pm 2.11 ^{bB}	33.71 \pm 1.56
Média	26.18 \pm 1.76	31.14 \pm 1.51	
Velocidade média da trajetória (VAP, μ m/seg)			
Ano1	34.09 \pm 3.01 ^{aA}	22.61 \pm 2.41 ^{aA}	28.35 \pm 1.95
Ano2	28.68 \pm 2.50 ^{aA}	51.34 \pm 2.35 ^{bB}	40.01 \pm 1.74
Média	31.39 \pm 1.96	36.97 \pm 1.68	
Linearidade (LIN, %)			
Ano1	63.35 \pm 3.46	55.05 \pm 2.81	59.20 \pm 2.39
Ano2	57.39 \pm 2.92	67.01 \pm 2.80	62.20 \pm 2.21
Média	60.37 \pm 2.28	61.03 \pm 2.00	
Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz)			
Ano1	9.94 \pm 0.66 ^{aA}	8.45 \pm 0.57 ^{aA}	9.19 \pm 0.44
Ano2	9.27 \pm 0.85 ^{aA}	11.60 \pm 0.42 ^{bB}	10.44 \pm 0.47
Média	9.61 \pm 0.54	10.03 \pm 0.35	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0.05$).

*Inverno, Ano 1: agosto e setembro/2014; Verão, Ano 1: fevereiro e março/2015; Inverno, Ano 2: agosto e setembro/2015; Verão, Ano 2: fevereiro e março/2016.

Quando os espermatozoides descongelados foram incubados a 37°C, a queda entre a 0h e os 120min no valor do parâmetro de frequência de batimento flagelar cruzado (Q_BCF) não sofreu influência de nenhum dos efeitos estudados. O ano de coleta influenciou a queda dos parâmetros velocidade curvilínea (Q_VCL) e velocidade média da trajetória (Q_VAP), tendo sido observada menor resistência desses parâmetros dos espermatozoides que foram congelados no ano 2 (maior valor de queda) (Tabela 3).

Percebeu-se uma maior perda do percentual de espermatozoides com velocidade rápida (Q_Rap), na motilidade total (Q_MT) e na motilidade progressiva (Q_MP) nas amostras coletadas no verão e no ano 2, mostrando uma interação significativa desses efeitos. Também no ano 2, porém no inverno, foram encontradas as maiores perdas da velocidade linear progressiva (Q_VSL) dos espermatozoides incubados a 37°C por duas horas (Tabela 3).

Houve efeito da interação do ano e estação de coleta do sêmen sobre os parâmetros de integridade de membrana plasmática, quer seja estrutural (medida por citometria de fluxo) quer seja funcional (medida por teste hiposmótico). O maior percentual de espermatozoides viáveis e de reagidos no teste hiposmótico após o descongelamento foi encontrado naquelas amostras coletadas no ano 2 e no verão. O percentual de espermatozoides com cromatina nuclear fragmentada pós-descongelamento foi maior no inverno, independentemente do ano (Tabela 4).

Tabela 3. Associação da estação e ano de coleta do sêmen com a longevidade das características cinéticas (média dos quadrados mínimos \pm erro padrão) de espermatozoides incubados a 37°C durante duas horas (representada pela queda dos parâmetros entre 0h e 2h) de touros búfalo criados em clima tropical úmido.

Ano	Estação		Média
	Inverno	Verão	
Queda da motilidade progressiva (Q_MP, %)			
Ano1	21.19 \pm 2.94 ^{aA}	10.91 \pm 2.37 ^{aA}	16.05 \pm 1.83
Ano2	10.65 \pm 2.43 ^{aA}	39.66 \pm 2.24 ^{bB}	25.16 \pm 1.59
Média	15.92 \pm 1.90	25.28 \pm 1.63	
Queda da motilidade total (Q_MT, %)			
Ano1	26.54 \pm 4.11 ^{aA}	25.97 \pm 3.31 ^{aA}	26.25 \pm 2.57
Ano2	19.61 \pm 3.39 ^{aA}	47.15 \pm 3.14 ^{bB}	33.38 \pm 2.24
Média	23.07 \pm 2.66	36.56 \pm 2.28	
Queda da velocidade rápida (Q_Rap, %)			
Ano1	20.96 \pm 3.81 ^{aA}	8.15 \pm 3.05 ^{aA}	14.55 \pm 2.47
Ano2	9.15 \pm 3.16 ^{aA}	47.42 \pm 2.97 ^{bB}	28.19 \pm 2.20
Média	15.05 \pm 2.47	27.79 \pm 2.13	
Queda da velocidade curvilínea (Q_VCL, μ m/seg)			
Ano1	25.61 \pm 4.31	22.84 \pm 3.48	24.22 \pm 2.91 ^A
Ano2	33.44 \pm 3.61	38.50 \pm 3.44	35.97 \pm 2.66 ^B
Média	29.53 \pm 2.82	30.67 \pm 2.45	
Queda da velocidade linear progressiva (Q_VSL, μ m/seg)			
Ano1	20.47 \pm 2.40 ^{aA}	15.29 \pm 1.93 ^{aA}	17.88 \pm 1.53
Ano2	18.92 \pm 1.99 ^{aA}	28.11 \pm 1.86 ^{aB}	23.52 \pm 1.35
Média	19.70 \pm 1.56	21.70 \pm 1.34	
Queda da velocidade média da trajetória (Q_VAP, μ m/seg)			
Ano1	21.92 \pm 2.94	18.43 \pm 2.36	20.18 \pm 1.91 ^A
Ano2	23.38 \pm 2.44	32.09 \pm 2.29	27.73 \pm 1.70 ^B
Média	22.65 \pm 1.91	25.26 \pm 1.64	
Queda da linearidade (Q_LIN, %)			
Ano1	24.54 \pm 5.52 ^{aA}	41.61 \pm 4.42 ^{aA}	33.08 \pm 3.54
Ano2	42.82 \pm 4.57 ^{aA}	10.24 \pm 4.27 ^{bB}	26.53 \pm 3.13
Média	33.68 \pm 3.58	25.93 \pm 3.08	
Queda da frequência de batimento flagelar cruzado (Q_BCF, Hz)			
Ano1	5.65 \pm 1.08	6.72 \pm 0.87	6.19 \pm 0.69
Ano2	6.39 \pm 0.90	2.72 \pm 0.84	4.56 \pm 0.61
Média	6.02 \pm 0.70	4.72 \pm 0.60	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0.05$).

*Inverno, Ano 1: agosto e setembro/2014; Verão, Ano 1: fevereiro e março/2015; Inverno, Ano 2: agosto e setembro/2015; Verão, Ano 2: fevereiro e março/2016.

Tabela 4. Associação do ano e estação de coleta com as características de integridade estrutural da membrana plasmática (Sybr⁺/PI⁻), integridade da cromatina (IDF total) e integridade funcional da membrana plasmática (HOST⁺) de espermatozoides após o descongelamento, de búfalos criados em clima tropical úmido (média dos quadrados mínimos ± erro-padrão).

Ano	Estação		Média
	Inverno	Verão	
Viabilidade (Sybr ⁺ /PI ⁻ , %)			
Ano1	27.40 ± 5.70 ^{aA}	19.75 ± 2.55 ^{aA}	23.57 ± 3.23
Ano2	18.97 ± 1.96 ^{aA}	33.34 ± 2.42 ^{bA}	26.15 ± 1.68
Média	23.19 ± 3.02	26.54 ± 1.76	
Índice de fragmentação do DNA (IDF total, %)			
Ano1	0.84 ± 0.15	0.24 ± 0.02	0.54 ± 0.08
Ano2	0.83 ± 0.26	0.43 ± 0.10	0.63 ± 0.14
Média	0.83 ± 0.15 ^a	0.33 ± 0.05 ^b	
Teste Hiposmótico (Positivos, %)			
Ano1	30.33 ± 2.97 ^{aA}	27.02 ± 2.38 ^{aA}	28.68 ± 1.90
Ano2	31.07 ± 2.46 ^{aA}	46.62 ± 2.30 ^{bB}	38.85 ± 1.68
Média	30.70 ± 1.93	36.82 ± 1.66	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0.05).

*Inverno, Ano 1: agosto e setembro/2014; Verão, Ano 1: fevereiro e março/2015; Inverno, Ano 2: agosto e setembro/2015; Verão, Ano 2: fevereiro e março/2016.

4. Discussão

As condições agroclimáticas de uma região exercem interferência em vários aspectos fisiológicos e reprodutivos das espécies domésticas, sobretudo aquelas criadas em regime extensivo. Portanto, estudos com vistas a propor um manejo reprodutivo ou mesmo o estabelecimento de regimes de coleta para produção de doses de sêmen para inseminação artificial devem buscar compreender essas relações. Frequentemente as avaliações padrão da qualidade do sêmen fresco de búfalo não são capazes de demonstrar variações de acordo com a estação de coleta (Henry *et al.*, 2017), porém podem estar presentes mudanças na composição molecular que interferem tanto na resposta ao processo de congelamento das células espermáticas, quanto na fertilidade futura (Nandre *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2015).

Os resultados do nosso estudo mostraram que existe uma variação sazonal da resposta qualitativa das células espermáticas ao processo de congelamento, em búfalos criados sob regime extensivo, com suplementação na seca, e clima tropical úmido. Os melhores resultados de parâmetros cinéticos após o descongelamento (MP, MT, Rap, VCL, VSL, VAP e BCF) e de integridade funcional da membrana plasmática (HOST⁺), foram encontrados naquelas amostras coletadas no verão do segundo ano de coletas. Apenas no ano 2 de coletas, a integridade estrutural da membrana plasmática (Sybr⁺/Pi⁻) foi melhor mantida após o descongelamento naquelas amostras coletadas no verão. Nesse estudo a estrutura da cromatina espermática foi relativamente estável após o descongelamento (baixo índice de fragmentação do DNA). Contudo, houve um índice ainda menor nas amostras coletadas no verão, independentemente do ano. Melhor qualidade espermática *in vitro* da amostra fresca e, em alguns casos, após o descongelamento do sêmen coletado em período de chuvas ou verão foi também relatado por outros autores em búfalos (Mandal *et al.*, 2003; Koonjaenak *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014, 2015; Castro *et al.*, 2017). Entretanto, outros trabalhos apontam para baixa resistência do

espermatozoide coletado no verão para o processo de congelamento da célula (Tuli e Mehar, 1983; Sagdeo *et al.*, 1991; Argov *et al.*, 2007 [bovino]).

Os maiores valores dos parâmetros cinéticos medidos pelo CASA após o descongelamento, como a VCL, VSL, VAP, Rap e MP, sobretudo quando analisadas em conjunto, apresentam forte correlação com a fertilidade da amostra de sêmen em búfalos (Ahmed *et al.*, 2017) e em bovinos (Farrell *et al.*, 1998). Esses parâmetros indicam o potencial de progressividade dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, que o permitiriam percorrer longas distâncias em menor tempo resultando em melhor capacidade de encontro com o oócito (Farrell *et al.*, 1998; Verstergen *et al.*, 2002). Aliado às características cinéticas, a manutenção da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, mesmo após o estresse provocado pelo processo de congelamento, medida pelo SYBR/PI e pelo teste hiposmótico, podem ser bons preditores da taxa de concepção (Oliveira *et al.*, 2013).

Em relação as condições microclimáticas da região em estudo, observou-se um padrão similar de variação da precipitação mensal e das temperaturas distribuídas entre os dois períodos, ou seja, nos dois anos de coletas seminais houve maior pluviosidade e maiores médias de temperaturas no verão em relação ao inverno. A quantidade de chuvas influencia diretamente na disponibilidade de água no solo para o crescimento e produtividade de plantas forrageiras. Mesmo aquelas espécies forrageiras consideradas de boa adaptabilidade, como é o caso da *Urochloa brizantha*, sofrem redução da taxa de crescimento, da área de lâminas foliares verdes e da produção de matéria seca (haste e folha) quando submetidas a situações de estresse hídrico (Pezzopane *et al.*, 2015). Costa e colaboradores (2005) observaram que a produção de matéria seca da *U. brizantha* cv. Marandu em situações de baixa precipitação e temperatura pode ser reduzida a um terço daquela observada em períodos chuvosos. Além disso, o teor de proteína bruta da planta também sofre decréscimo linear com a redução da quantidade de água no solo, podendo implicar na redução da digestibilidade da planta e no consumo voluntário dos animais em condições de pastejo (Costa *et al.*, 2005).

Com base nos conhecimentos da fisiologia vegetal, pode-se inferir então que no verão houve maior produção de massa verde, bem como melhor qualidade nutritiva da forragem disponível aos animais no presente estudo. Apesar da suplementação fornecida uma vez ao dia para os animais (silagem de sorgo) durante os períodos de menor precipitação, foi possível observar uma queda de 0.5 a 1 ponto no escore corporal (escala 1 a 5) dos animais nesse período em relação ao verão, segundo critérios de avaliação propostos por Ferguson *et al.* (1994) (dados não publicados). Dessa forma, um melhor balanço energético (positivo) dos animais durante o verão pode ter contribuído para a melhor resposta das células espermáticas ao processo de congelamento.

Os efeitos da nutrição sobre a função reprodutiva dos machos mamíferos podem ser entendidos por repercussões diretas ou indiretas sobre os centros nervosos do indivíduo, provocando redução da secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Independente de qual via endócrina, os resultados percebidos em animais submetidos a restrição alimentar são mudanças na massa testicular (túbulos seminíferos) e da eficiência da espermatogênese e maturação espermática, variando em decorrência da intensidade e duração da restrição (Martin *et al.*, 2010). Além dos efeitos diretos sobre a espermatogênese, mudanças do perfil bioquímico e da expressão de proteínas no plasma seminal podem ocorrer em decorrência da função das glândulas genitais anexas, que estão sob controle endócrino da testosterona (Kumar *et al.*, 2017).

Por outro lado, as condições ambientais podem também influenciar na termorregulação corporal e testicular dos animais. Tipicamente no verão, a combinação de maiores temperaturas e pluviosidade acarretam no aumento da umidade relativa do ar, resultando em dificuldade da perda

de calor por transpiração. O estresse térmico dessa época é frequentemente associado a piores desempenhos reprodutivos (Argov *et al.*, 2007), em razão, entre outros mecanismos fisiológicos, da hiperprolactinemia que tem efeito depressor sobre a secreção pulsátil de gonadotrofinas (Morais *et al.*, 2008). Apesar disso, no presente estudo, as amostras seminais obtidas no verão foram as que tiveram melhor resposta ao processo de congelamento. Destaca-se que a capacidade de termorregulação é uma característica relacionada a espécie, raça e mesmo indivíduo, podendo ser essa umas das razões da grande variabilidade dos resultados encontrados na literatura para a qualidade do sêmen de búfalos coletados em diferentes épocas do ano em diferentes latitudes.

Na espécie bubalina, a capacidade evaporativa é considerada baixa uma vez que possuem menor densidade de glândulas sudoríparas e pelos no corpo e no escroto, quando comparados à espécie bovina. Por esse motivo a troca de calor por condução/contato é extremamente importante na termorregulação do búfalo, razão pela qual os animais são frequentemente vistos em poças de água ou barro (Garcia, 2006; Marai e Haebe, 2010). Durante o segundo ano de coletas e especialmente no verão, nesse estudo, destacam-se o pico de chuva e de umidade relativa do ar em janeiro/2016 (Figura 1), período que precedeu as coletas de sêmen do verão, ano 2. Sugere-se que esses fatores possam, nesse caso, ter influenciado positivamente na troca de calor dos touros criados em regime extensivo, favorecendo o conforto térmico e a sua qualidade seminal. Essa hipótese necessita de estudos mais detalhados para comprovação. Barros *et al.* (2015), avaliando búfalos criados em clima tropical na região Norte do Brasil, demonstraram a eficiente capacidade de ativação dos mecanismos de termólise para manter a homeostasia corporal, mesmo em condições climáticas consideradas estressantes.

Apesar de, em nosso estudo, a época de chuva do ano 2 ter sido o período mais indicado para a coleta de sêmen visando criopreservação das amostras, nesse mesmo ano houve uma tendência de menor resistência espermática à incubação a 37°C, representada pela maior queda dos parâmetros cinéticos Q_VCL, Q_VAP, Q_Rap, Q_LIN e Q_BCF, entre a avaliação imediatamente após o descongelamento e a avaliação às duas horas de incubação. Duas hipóteses podem ser discutidas, contudo ambas requerem estudos mais detalhados para a correta definição. Quando as condições de incubação *in vitro* não consideram a renovação dos substratos energéticos ao longo do tempo, as altas taxas metabólicas dos espermatozoides com maiores valores de cinética, podem resultar em um esgotamento de reservas ou até mesmo em um aumento de catabólitos no meio, que provocariam uma paralisação das células espermáticas (Fernandez-Gago *et al.*, 2013; Del Omo *et al.*, 2015). Por outro lado, as variações externas podem ter provocado uma modificação da composição molecular do plasma seminal, como concentração de íons ou proteínas específicas, que proporcionem maiores valores de motilidade iniciais, mas com tendência negativa quando mantidas em contato prolongado com a célula espermática (Soleilhavoup *et al.*, 2014).

5. Conclusão

Os resultados desse estudo indicam que há uma associação dos fatores bioclimáticos e da congelabilidade do sêmen de búfalos, criados em regime extensivo e em clima tropical úmido. O melhor período para coleta de sêmen visando a criopreservação, sob essas condições, é o verão, com destaque favorável aos períodos com maiores índices de precipitação e umidade relativa do ar.

Capítulo 3 – Variações sazonais na intensidade de expressão de proteínas do plasma seminal de búfalos criados em clima tropical úmido: resultados preliminares

1. Introdução

No momento da ejaculação, os espermatozoides são misturados ao fluido seminal produzido em maior parte pelas glândulas genitais anexas, que irão prover os substratos necessários para a realização dos diversos processos que envolvem a fertilização do oócito. As funções do plasma seminal sobre os espermatozoides vão desde simples veículo de transporte e fonte nutritiva, até importantes implicações sobre os mecanismos de motilidade progressiva, hipermotilidade, reação acrossômica, defesa contra o ataque imunológico ou ativação do mesmo em pontos específicos do trato reprodutivo da fêmea e interação com o oócito (Mann, 1974; Poiani, 2006; Juyena e Stelletta, 2012).

A razão espermatozoides e plasma seminal depende em grande parte da presença, tamanho e capacidade de armazenamento das glândulas genitais anexas e da capacidade de produção dos testículos, o que leva a uma variação significativa entre espécies e entre indivíduos da mesma espécie (Rodríguez-Martinez *et al.*, 2011). Fatores externos também podem afetar a composição do plasma seminal, como o fotoperíodo, nutrição, estresse, manejo, entre outros (Nandre *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017).

O plasma seminal contém uma grande diversidade de proteínas, o que torna o estudo proteômico complexo. Contudo, estudos recentes têm confirmado que o conhecimento profundo da expressão das proteínas no líquido seminal permitirá a identificação de biomarcadores associados a patologias reprodutivas ou a um maior potencial de fertilidade dos espermatozoides, bem como à uma maior resistência espermática ao processo de criopreservação (Harayama *et al.*, 2017).

Com o objetivo de aumentar o conhecimento acerca do perfil proteico do plasma seminal de búfalos, foi proposto identificar o padrão de bandas de proteínas, utilizando SDS-PAGE, de acordo com a época do ano, **inverno e verão**.

2. Material e métodos

2.1. Local e animais experimentais

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG 129/2014).

Os animais foram mantidos no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura (CBB), localizado em Pedro Leopoldo, MG, Brasil (19°37'04''S, 44°02'34''O, com altitude média de 730 metros). A região tem clima tropical úmido - *Aw* (Kottek *et al.*, 2006), com pluviosidade média anual de 1320 mm e média anual de temperatura de 21,8°C. As variáveis climáticas precipitação acumulada mensal, umidade relativa do ar e temperatura média, foram obtidas da estação climática do Setor de Estudos Climatológicos do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA), localizado a 5,7 km do local de manejo e criação dos animais.

Seis touros búfalo adultos (5-6 anos), da raça Murrah, foram utilizados para a coleta de sêmen com vagina artificial aquecida (42-45°C), após exposição a uma búfala em estro ou não. Os

animais eram mantidos em regime de coletas de sêmen semanal, para manutenção dos parâmetros seminiais. No total foram utilizados nesse estudo vinte e quatro ejaculados, coletados ao final de cada uma das estações estudadas (aproximadamente 50 dias após o início da estação), inverno (n=12) e verão (n=12) do ano experimental (junho/2014 a maio/2015). Esse intervalo para a coleta foi escolhido para refletir o efeito específico da estação sobre a espermatogênese e maturação espermática (Sharma *et al.*, 2016).

O inverno (agosto e setembro) foi caracterizado por 19.60 mm de precipitação total, umidade relativa do ar média de 50.66% (\pm 8.32) e temperatura média de 21.29°C (\pm 2.42). Nesse período o índice de temperatura e umidade foi de 20.3, indicando ausência de desconforto térmico para búfalos, segundo Marai e Haebe (2010). O verão (fevereiro e março) em contrapartida, foi caracterizado por uma precipitação total acumulada de 283.90 mm, com umidade relativa do ar média de 70.10% (\pm 9.92) e temperatura média de 23.31°C (\pm 1.55). O índice de temperatura e umidade calculado para o período foi de 22.9, sugerindo que os animais poderiam estar submetidos a algum desconforto térmico moderado, segundo Marai e Haebe (2010).

A equação utilizada para o cálculo do índice temperatura-umidade foi proposta por Marai *et al.* (2001): $ITU = db^{\circ}C - [(0.31 - 0.31RH)(db^{\circ}C - 14.4)]$, onde $db^{\circ}C$ é a temperatura do bulbo seco em grau celsius e RH é o percentual de umidade relativa do ar dividido por 100. Valores abaixo de 22.2 indicam ausência de estresse térmico, entre 22.2 e 23.3 estresse moderado e entre 23.3 e 25.6 estresse severo (Marai e Haebe, 2010).

2.2. Avaliação do sêmen e coleta do plasma seminal

Imediatamente após a coleta, cada amostra de sêmen foi dividida em duas alíquotas. Uma alíquota foi utilizada para avaliar a qualidade seminal: motilidade de massa (turbilhão espermático), motilidade total, vigor espermático, concentração espermática e morfologia espermática, usando metodologias padrão (CBRA, 2013).

A outra parte do sêmen, uma alíquota de aproximadamente 1 mL, foi centrifugada a 1600 g por 15 min para separação do plasma seminal. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e mantido a -20°C para futuras análises (Chacur *et al.*, 2014).

2.3. Preparação do plasma seminal e SDS-PAGE

As amostras de plasma seminal foram descongeladas e adicionadas de um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, USA), a uma proporção de 1:100. Na sequência uma nova centrifugação foi realizada para remover resíduos celulares (10000 g, 60 min, 4°C).

O conteúdo de proteína total foi estimado pelo método Bradford (Bradford, 1976). As amostras de plasma seminal foram submetidas a SDS-PAGE, com o uso de gel de poliacrilamida a 15%. A massa molecular aparente das bandas de proteínas foi estimada usando um kit de calibração de alto e baixo peso molecular (GE Healthcare, UK). Vinte microgramas de proteína de cada amostra foram misturados com 10 microlitros de tampão de amostra (2.5 mL solução Tris 1.5M, 4 mL SDS 10%, 2 mL glicerol, 0.31g DTT, para 10 mL de solução final e traços de azul de bromofenol).

A corrida de eletroforese foi realizada a 25 mA por unidade de gel. Depois da eletroforese os géis foram corados com Comassie blue G-250 (Pharmacia Biotech, USA), por 12 horas, e então descorado com solução de ácido acético 7% (v/v) e metanol 40% (v/v). Os géis foram analisados usando o software QuantityOne (Bio-Rad, USA).

2.4. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, onde cada animal foi considerado como bloco. Todas as características seminais e as intensidades das bandas de proteínas foram avaliadas quanto a sua distribuição pelo teste de normalidade de Shapiro-Willk, usando o procedimento UNIVARIATE, com a opção NORMAL do software SAS, v.9 (SAS, 2002).

Todas as variáveis foram submetidas a análise de variância por meio do procedimento GLM do SAS, e em seguida suas médias foram comparadas entre as estações inverno e verão pelo teste “t” de Student.

3. Resultados

Os resultados da avaliação do sêmen imediatamente após a coleta estão apresentados como média \pm desvio padrão, na Tabela 1. Os valores médios obtidos para motilidade de massa, motilidade total, vigor espermático, total de espermatozoides por ejaculado e espermatozoides morfológicamente normais não variaram significativamente entre as épocas de coleta do sêmen ($P < 0.05$).

Tabela 1- Média e desvio-padrão das variáveis seminais, imediatamente após a coleta, de búfalos mantidos em regime de criação extensivo, coletados nas épocas inverno (agosto/setembro) e verão (fevereiro/março).

Característica seminal	Seca	Chuva
Motilidade de massa (1-5)	2.4 \pm 1.2	2.2 \pm 0.9
Motilidade total (%)	85.4 \pm 9.6	84.2 \pm 6.7
Vigor espermático (1-5)	4.6 \pm 0.5	4.5 \pm 0.5
Total de espermatozoides por ejaculado ($\times 10^6$)	2376.6 \pm 1581.1	2468.1 \pm 1811.2
Espermatozoides morfológicamente normais (%)	89.7 \pm 3.5	91.7 \pm 3.6

A separação das proteínas do plasma seminal por peso molecular, utilizando gel de poliacrilamida (SDS) resultou em 22 bandas, presentes em todos os animais, independente da época de coleta da amostra (Figura 1). A faixa de peso molecular das bandas de proteínas variou de 278 kDa a 11.7 kDa.

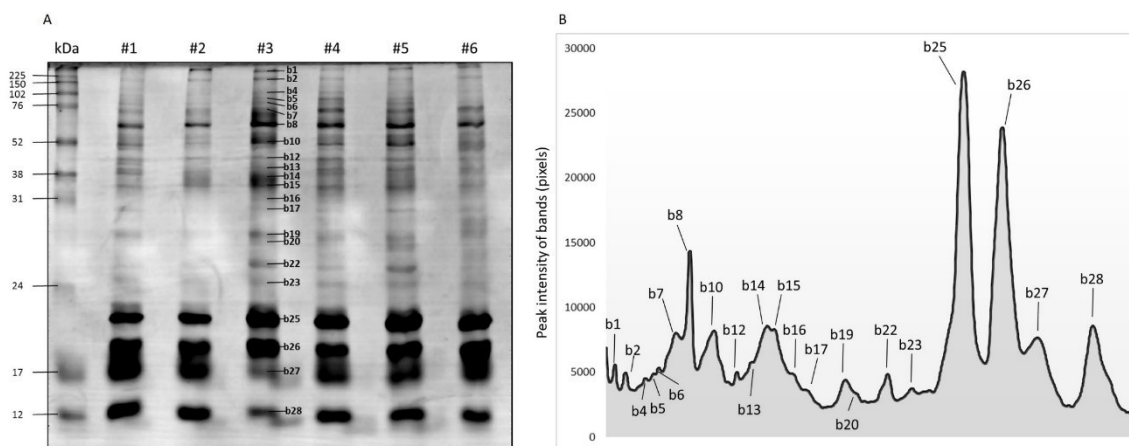


Figura 1 – A: Perfil uni-dimensional das proteínas do plasma seminal de búfalos separado por SDS-PAGE em gel de poli-acrilamida a 15%, evidenciando as bandas de proteínas presentes em todos os animais. B: Mapa das intensidades das bandas detectadas em A.

O perfil de proteínas do plasma seminal (kDa) de búfalos coletados no inverno e verão está apresentado na Figura 2. A análise dos géis revelou que seis bandas de proteínas tiveram maior intensidade de expressão no verão ($P < 0.05$): banda 19 (28.6 kDa), 22 (25.5 kDa), 23 (24.2 kDa), 25 (20.8 kDa), 26 (18.6 kDa) e 27 (16.7 kDa) (Figura 3).

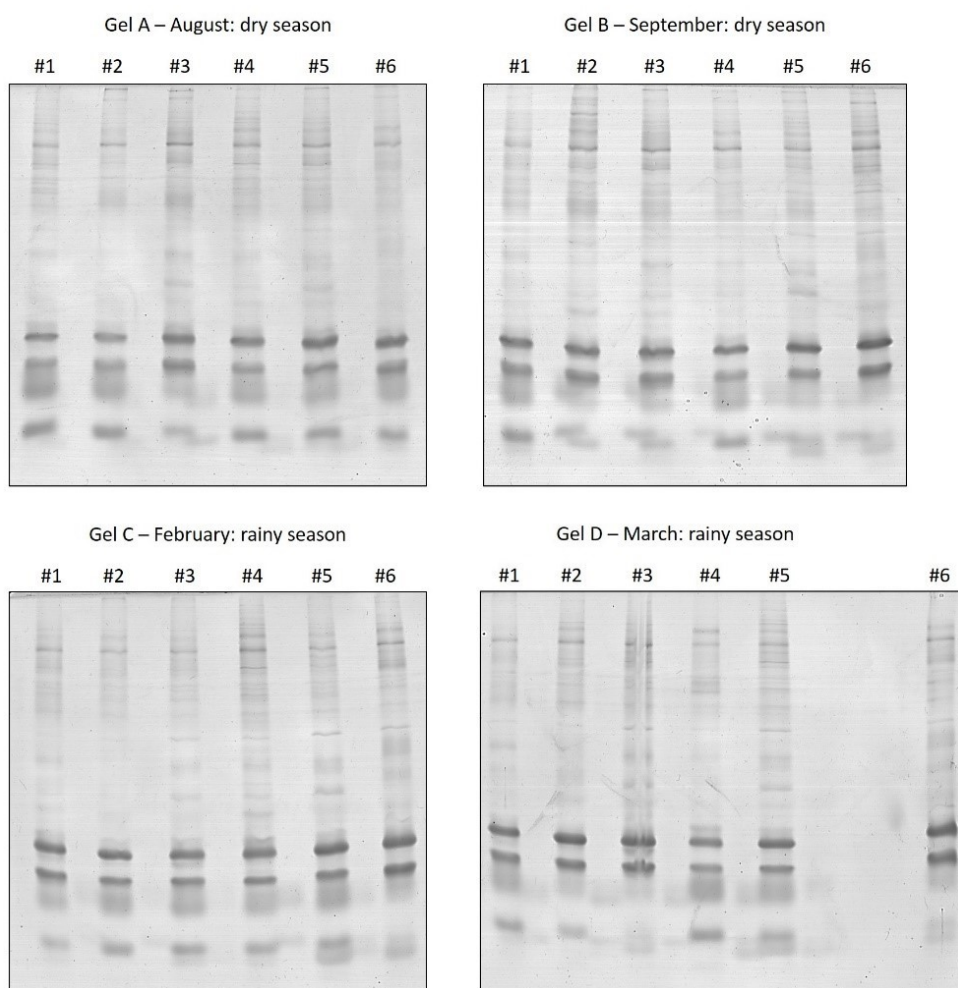


Figura 2 – Perfil proteico do plasma seminal de búfalos coletados no inverno (agosto/setembro) (géis A e B) e verão (fevereiro/março) (géis C e D).

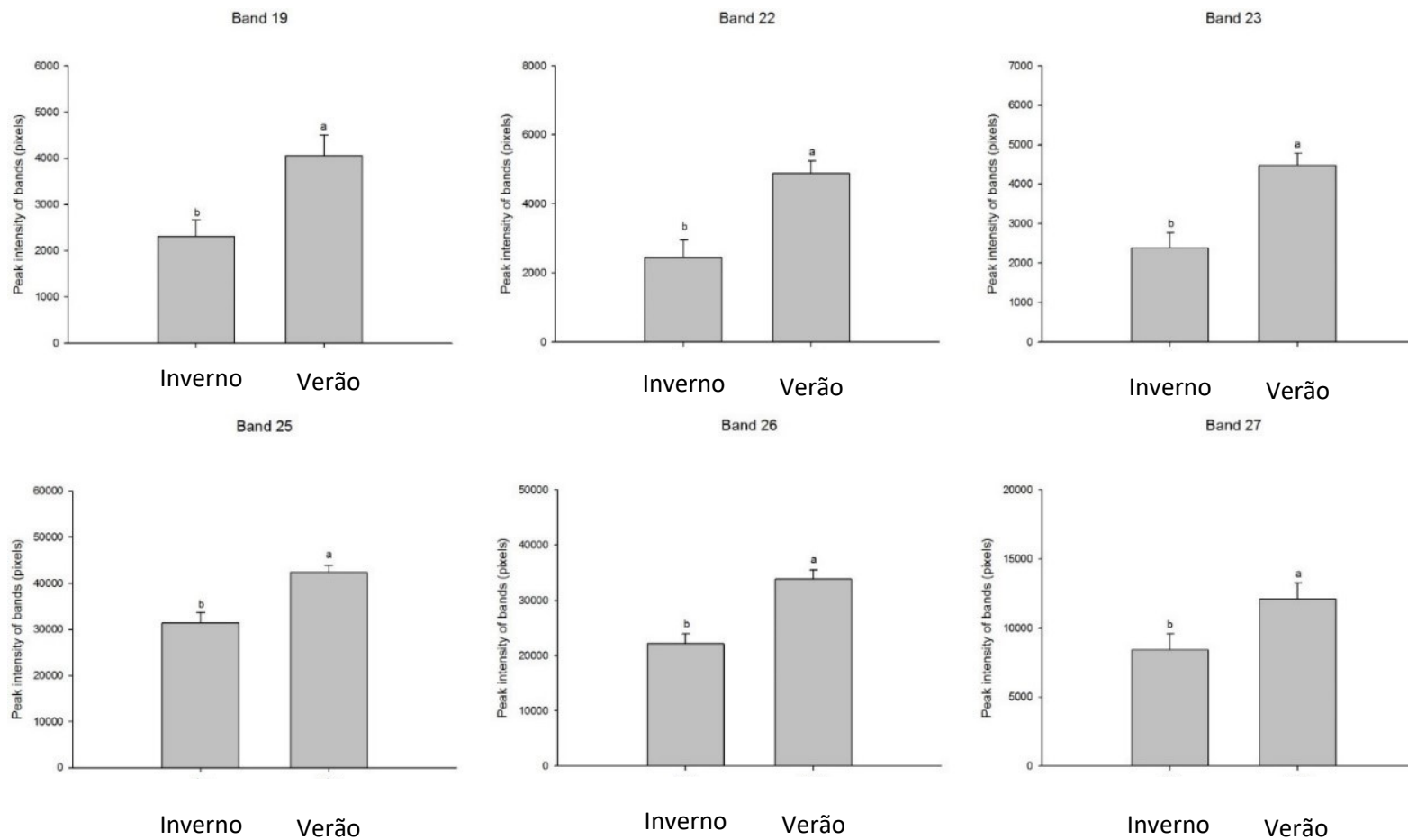


Figura 3 – Diferença na intensidade de expressão das bandas de proteínas do plasma seminal diferencialmente expressas entre as amostras coletadas no inverno e verão. Letras diferentes sobrescritas nas barras indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

4. Discussão

Nesse estudo não foi possível observar, com base nas análises de qualidade espermática *in vitro*, diferenças entre as amostras de sêmen fresco coletadas no inverno ou verão ($P > 0.05$).

Os resultados relacionados ao efeito da estação de coleta sobre os parâmetros *in vitro* de qualidade seminal de búfalos são bastante controversos, mostrando desde a ausência de efeito até melhor qualidade seminal em estações seca/fria, quente/seca e quente/úmida (Dixit *et al.*, 1984; Heuer *et al.*, 1987; Bahga e Khokar, 1991; Asadpour *et al.*, 2007; Koonjaenak *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2014). Os resultados conflitantes são atribuídos a interação de vários fatores, como raça, manejo de criação, intensidade das mudanças climáticas, disponibilidade e qualidade de alimento e água, e a junção de todos esses fatores com a capacidade de adaptação do indivíduo (Moosa-ali *et al.*, 2015). Enquanto, por exemplo, o fim do verão pode ter um efeito positivo pelo encurtamento da duração da luz em países do hemisfério norte, por outro lado pode representar a possibilidade de desconforto térmico, em locais com predomínio de clima tropical úmido.

O índice de temperatura e umidade calculado durante o verão no presente experimento indicou que os animais coletados poderiam estar submetidos a algum tipo de desconforto térmico moderado, segundo classificação proposta por Marai e Haebe (2010). Esse quadro de desconforto, no entanto, não foi acompanhado por mudanças detectáveis nas características do sêmen fresco, nem no comportamento dos animais frente as tentativas de coleta (dados não publicados). Entretanto, foi evidente a maior intensidade de expressão de proteínas de menor peso molecular no plasma seminal coletado durante o verão. Isso sugere que as mudanças climáticas e suas consequências indiretas, como a flutuação na disponibilidade de forragem ou o desconforto térmico, podem não promover mudanças imediatas visíveis nas características reprodutivas de búfalos, mas seriam capazes de causar mudanças a nível molecular, como visto no perfil proteico do plasma seminal. Essas mudanças poderiam resultar em pior resposta aos processos de criopreservação do sêmen e/ou pior fertilidade (Asadpour *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2017). Mudança no padrão de expressão de proteínas no plasma seminal também foi descrita em búfalos criados no norte da Índia, latitude 27°N, clima semi-árido, porém com maior expressão de proteínas com peso molecular superior a 46 kDa em estação de maiores temperaturas (Sharma *et al.*, 2014).

Entre as proteínas de baixo peso molecular descritas em ruminantes, a família de proteínas conhecida como proteínas ligadoras de espermatozoide (BSP1, BSP3 e BSP5), com peso molecular variando entre 14 e 30 kDa, desempenham funções relacionadas ao processo de capacitação espermática. As BSPs se ligam à membrana plasmática do espermatozoide durante a ejaculação e são conduzidas dentro do trato reprodutor feminino até a tuba uterina. Durante a capacitação do espermatozoide as proteínas BSP auxiliam na remoção de colesterol e fosfolípedes da membrana, por meio de sua interação com HDL e heparina, presentes no fluido da tuba uterina, causando a desestabilização da membrana plasmática (Manjunath e Thérien, 2002; Plante *et al.*, 2016). Quanto maior for a ligação dessas proteínas ao espermatozoide ejaculado mais precocemente ocorrerão as mudanças na membrana espermática. Essas mudanças aumentam potencialmente a sensibilidade das células aos danos celulares que levam a uma menor motilidade e viabilidade espermáticas após o descongelamento (Harshan *et al.*, 2006). A hipótese que as bandas proteicas encontradas nesse estudo possam estar entre aquelas da família BSP é reforçada por evidências de proteínas com peso molecular de 16 e 24 kDa estarem entre as proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal de búfalos (Arangasamy *et al.*, 2005), e a proteína de 14,3 kDa ter sido sugerida como proteína similar a BSP1-bovina, também no plasma seminal de búfalos (Harshan *et al.*, 2009).

Outro relevante grupo de proteínas de baixo peso molecular encontrado no plasma seminal de mamíferos são as espermadinas (12-16 kDa). Alguns autores chamam esse grupo de proteínas de fatores antifertilidade (Moura, *et al.*, 2006). Tem sido sugerido que essas proteínas têm propriedades decapacitantes, interferindo com a atividade da enzima ATPase, reduzindo a atividade mitocondrial e então a velocidade dos espermatozoides (Iwamoto *et al.*, 1995). Dessa forma, uma maior expressão desse grupo de proteínas no plasma seminal seria indesejável quando se pretende a criopreservação da amostra de sêmen, podendo até mesmo repercutir em piores índices de fertilidade futura.

Esse estudo mostrou alterações significativas na expressão de proteínas do plasma seminal de búfalos em diferentes épocas do ano. Contudo, são necessários futuros estudos com o objetivo de analisar a flutuação da qualidade espermática após o descongelamento segundo as épocas do ano e a relação com as proteínas identificadas expressas em cada época.

5. Conclusão

Nesse estudo foi evidente que a expressão de proteínas do plasma seminal em touros búfalo, particularmente as de baixo peso molecular, foram associadas a mudanças bioclimáticas, com maior intensidade de expressão dessas últimas no verão (proteínas variando de 16.7 a 28.6 kDa).

CAPÍTULO 4 – Associação entre a sazonalidade e a composição proteica do plasma seminal e congelabilidade do sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados em clima tropical úmido

1. Introdução

A espécie bubalina é dita sazonal de dias curtos, entretanto, nas regiões tropicais e subtropicais, apresenta potencial para se reproduzir ao longo de todo o ano (Garcia, 2006; Vale, 2007). Condições macro e microclimáticas, como temperatura do ar, umidade relativa e pluviosidade, têm sido apontadas como fatores limitantes ao desempenho reprodutivo, acarretando perdas econômicas significativas para o sistema de produção. As baixas performances reprodutivas de búfalos domésticos, bem como de outros mamíferos, durante os meses quentes e úmidos do verão nas regiões tropicais, têm sido relacionadas a uma ineficiência em manter sua termorregulação corporal sob essas condições e às alterações endócrinas, diretas ou indiretas, provocadas pelo estresse térmico (Brito *et al.*, 2004; Garcia, 2006). Características anatômicas como pele escura e menor quantidade de glândulas sebáceas e pelos na superfície corporal, predispõe a maior absorção de calor e dificultam a termólise no bubalino (Marai e Haebe, 2010).

Diante dos prejuízos provocados pelo estresse térmico, foram propostos alguns índices matemáticos que buscam estimar o potencial das características ambientais em induzir o estresse. Entre os índices mais utilizados, o índice de temperatura e umidade (ITU) recebe destaque, e são propostas várias fórmulas para o seu cálculo (Marai e Haebe, 2010). O ITU considera o ambiente térmico global que circunda o animal, utilizando no cálculo a temperatura média do ar e a umidade relativa. Em búfalos, o efeito significativo desses fatores sobre a temperatura da superfície escrotal foi demonstrado por Ahirwar *et al.* (2017), porém as repercussões fisiológicas e

reprodutivas para o animal irão variar de acordo com o manejo e tipo de criação e a capacidade de adaptação individual (Garcia, 2006).

Como já é bem conhecido, a espermatogênese e a maturação espermática são sensíveis às altas temperaturas testiculares, portanto uma falha ou ineficiência dos mecanismos de termorregulação testicular levam a perda de qualidade do sêmen (Singh *et al.*, 2001), além de mudanças no perfil bioquímico do plasma seminal na maioria das espécies domésticas, incluindo o búfalo (Pandey *et al.*, 2014).

As proteínas são os principais constituintes do plasma seminal, e estão envolvidas em vários fatores relacionados a função, transporte e sobrevivência dos espermatozoides dentro do trato reprodutivo do macho e da fêmea (Moura *et al.*, 2011). Existem fortes indicações *in vitro* de que algumas dessas proteínas estariam relacionadas à resistência ao processo de congelamento, demonstrado em bovinos (Jobim *et al.*, 2004), equinos (Jobim *et al.*, 2011), ovinos (Rickard *et al.*, 2015) e búfalos (Asadpour *et al.*, 2007). Além disso, variações ao longo do ano, tanto qualitativas quanto quantitativas, das proteínas do plasma seminal também foram atribuídas às espécies mamíferas - caprinos (La Falci *et al.*, 2002), ovinos (Cardozo *et al.*, 2006) e bubalinos (Sharma *et al.*, 2014). Essas mudanças estariam relacionadas às mudanças sazonais endócrinas que afetam a secreção das glândulas genitais anexas (Bahga e Khokar, 1991; Mayahi *et al.*, 2014), principais órgãos responsáveis pela produção e secreção dessas proteínas. Contudo, as funções específicas das proteínas em relação às funções espermáticas permanecem inconclusivas.

Dentro deste contexto, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar a associação da estação de coleta de sêmen de búfalos sobre os parâmetros de qualidade seminal após o descongelamento, criados em regime extensivo e em região de clima tropical úmido. Além disso, objetivou-se identificar as principais proteínas do plasma seminal desses animais e buscar marcadores que demonstrem os efeitos da estação de coleta sobre o perfil de expressão proteica do plasma seminal.

2. Material e métodos

2.1. Caracterização do clima e desenho experimental

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura (Pedro Leopoldo, MG, Brasil - 19°37'04''S, 44°02'34''O, altitude média 730 metros). O clima na região é caracterizado como tropical úmido (*Aw*), de acordo com a classificação climática de Koppen (Kottek *et al.*, 2006). A pluviosidade média anual histórica é de 1320 mm, com diferenças de 290 mm entre os meses mais chuvosos e os mais secos. A temperatura média anual é próxima a 21.8°C, com variações de 5.3°C, tradicionalmente.

O período total do estudo abrangeu os meses de junho de 2014 a maio de 2015. Para monitoramento do padrão climático durante o período experimental as variáveis temperatura média e umidade relativa do ar e a precipitação acumulada mensal foram obtidas da estação climática do Setor de Estudos Climatológicos do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA), localizado a 5,7 km do local de manejo e criação dos animais. Os dados de temperatura média e umidade relativa foram utilizados para calcular o índice de temperatura e umidade (ITU), que foi utilizado como um indicador de desconforto térmico dos animais (Figura 1). A equação utilizada foi proposta em Marai *et al.* (2001): $ITU = db^{\circ}C - [(0.31 - 0.31RH)(db^{\circ}C - 14.4)]$, onde $db^{\circ}C$ é a temperatura do bulbo seco em grau Celsius e RH é o percentual de umidade relativa do ar dividido por 100. A interpretação dos dados seguiu os seguintes critérios: valores abaixo de 22.2

indicam ausência de estresse térmico, entre 22.2 e 23.3 estresse moderado e entre 23.3 e 25.6 estresse severo (Marai e Haebe, 2010).

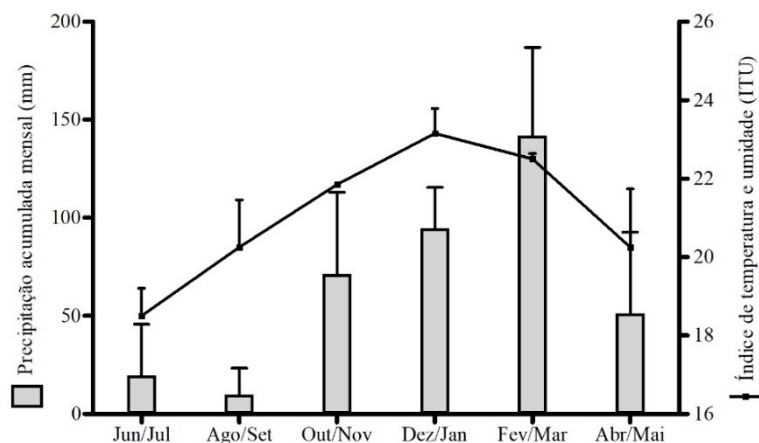


Figura 1 – Precipitação acumulada e índice de temperatura e umidade (ITU*) obtidos no período de junho/2014 a maio/2015, na cidade de Pedro Leopoldo, MG, Brasil (19°37'04''S, 44°02'34''O). *ITU calculado pela fórmula proposta por Marai et al. (2001).

As estações de coleta de sêmen para esse experimento foram selecionadas com base em dois critérios: épocas de menor e de maior precipitação acumulada (inverno e verão, respectivamente); e no período de aproximadamente 50 dias subsequente ao início da estação. Esse intervalo de tempo foi escolhido buscando-se aproximar do período total da espermatogênese e maturação espermática relatada para a espécie (~ 39 dias e 9.3 dias, respectivamente) (Sharma *et al.*, 2016). Dessa forma foram definidas para estudo a estação de inverno, como sendo os meses de agosto e setembro de 2014, e a estação do verão, incluindo os meses de fevereiro e março de 2015 (Tabela 1). Os ejaculados coletados nessas estações foram preparados para o processo de congelamento do sêmen e extração do plasma seminal. Foram realizadas análises de qualidade seminal após o descongelamento, bem como a avaliação comparativa do perfil proteico entre as amostras de plasma seminal coletadas nas duas épocas.

Tabela 1 – Variáveis climáticas (média ± desvio padrão) obtidas no inverno (agosto – setembro/2014) e verão (fevereiro – março/2015), selecionadas para a coleta de sêmen de touros búfalo criados em regime extensivo.

	Inverno	Verão
Temperatura média (°C)	21.29 ± 2.42 ^a	23.31 ± 1.55 ^b
Umidade relativa (%)	50.66 ± 8.32 ^a	70.10 ± 9.92 ^b
Precipitação acumulada do período (mm)	19.60	283.90
Índice de temperatura e umidade (ITU)	20.21 ± 1.98 ^a	22.44 ± 1.18 ^b

Letras diferentes indicam diferença entre as épocas, pelo teste t a uma significância de 5%.

2.2. Animais, coleta e processamento do sêmen

As amostras de sêmen foram coletadas de seis búfalos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) (34 ± 8 meses), mantidos sob regime de coleta de sêmen semanal, com auxílio de vagina artificial aquecida (42-45°C). Foram utilizados ejaculados com o mínimo 70% de motilidade total, 3 de

vigor espermático e menos de 30% de defeitos espermáticos (CBRA, 2013). No total foram submetidos ao processo de congelamento 24 ejaculados, coletados na época de inverno (n=12) e verão (n=12).

Os animais foram mantidos sob regime de manejo extensivo em piquetes coletivos (*Urochloa brizantha* cv Marandu), com presença de sombras arbóreas, com suplementação de volumoso, fornecido uma vez ao dia, durante os períodos de seca (silagem de sorgo), tendo acesso a sal mineral e água *ad libitum*. Os animais não receberam nenhum tratamento hormonal, e foram expostos ao fotoperíodo e às demais condições climáticas da região. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG – 129/2014).

Para o congelamento, uma fração de cada ejaculado foi diluída a uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides/mL utilizando meio diluidor comercial, a base de gema de ovo centrifugada (BotuBov[®], SP, Brasil). As amostras de sêmen diluídas foram envazadas em palhetas de 0.25 mL, resfriadas a 5°C (-0.25°C/min) e mantidas em equilíbrio a 5°C por um tempo de 4 horas, em máquina computadorizada de resfriamento de sêmen (TK 4000[®], MG, Brasil). As palhetas resfriadas foram colocadas a 5 cm da superfície do nitrogênio líquido por 20 minutos, e então armazenadas em botijão criogênico (-196°C).

Aproximadamente 1 mL de cada ejaculado foi centrifugado a 1600 g durante 15 min, para obtenção do plasma seminal que foi imediatamente armazenado a -20°C para futuras análises (Chacur *et al.*, 2014).

2.3. Análises da qualidade seminal após descongelamento

2.3.1. Cinética espermática medida com CASA

Os parâmetros da cinética espermática foram avaliados pelo sistema CASA (SCA[®], v.4, Microptic, Espanha). Duas palhetas de cada ejaculado foram descongeladas em banho-maria (37°C, 30 s) e reunidas em um microtubo pré-aquecido (37°C). Os pools de amostras foram analisados com o CASA cinco minutos após o descongelamento (0h) e novamente após 120 min (2h) de incubação a 37°C. Para verificar a longevidade das amostras de sêmen foi tomado o valor da diferença entre as análises 2h e 0h, representando a queda sofrida durante o período de incubação. Dessa forma, quanto menor a resistência dos espermatozoides da amostra à temperatura/tempo de incubação, maior o valor de queda apresentado.

Para a análise, uma alíquota de 5 µL de amostra foi colocado sobre lâmina/lâminula aquecidas, sendo analisadas no mínimo 300 células em pelo menos cinco campos escolhidos aleatoriamente. Vinte e cinco imagens por segundo foram tomadas. Em cada amostra a motilidade progressiva (MP %), motilidade total (MT %) e móveis com velocidade rápida (Rap %), bem como a velocidade curvilínea (VCL µm/s), velocidade linear progressiva (VSL µm/s), velocidade média da trajetória (VAP µm/s), linearidade (LIN %) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF Hz) foram determinados. Segundo as configurações do sistema, os espermatozoides foram considerados progressivos se a retilinearidade (STR) > 70% e com trajetória circular se LIN < 50%. Espermatozoides apresentando VCL > 50 µm/s foram classificados como velocidade rápida. A área da partícula considerada para leitura foi entre 20 e 70 microns².

2.3.2. Análises de citometria de fluxo

As análises de integridade estrutural da membrana plasmática (viabilidade espermática) e integridade do DNA espermáticos foram desenvolvidas utilizando o citometro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson, São José, USA) equipado com 15 mW laser de Argônio, excitando a 488 nm e medindo emissão de 488 a 774 nm de comprimento de onda. Depois da aquisição, os dados foram avaliados no software FlowJo (v.7.6.1, TreeStar Inc, CA, USA).

A viabilidade espermática foi analisada empregando-se dois corantes fluorescentes que se ligam ao DNA: o Sybr Green (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), um corante permeável à membrana plasmática, e o Iodeto de Propídio (PI – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), um corante convencional para marcação de células mortas. O Sybr Green foi diluído 1:10 em PBS, para a solução de trabalho. Cinco microlitros dessa solução de trabalho foram adicionados à 1 mL de sêmen diluído em PBS a uma concentração final de 4×10^6 espermatozoides/mL. Em sequência, quinze microlitros de solução PI (0.01 mg/mL) foram adicionados à mistura e então incubado por 10 minutos antes da análise. Cada amostra foi analisada por meio da aquisição de 30,000 eventos totais, e o resultado foi expresso em percentual de espermatozoides viáveis (Sybr Green⁺/PI).

A integridade da cromatina nuclear foi testada usando o teste de estrutura da cromatina espermática (SCSA) (Evenson e Jost, 2000). Uma amostra de 4×10^5 espermatozoides foi diluída em 100 µL de tampão TNE (0.01 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) e incubado com 200 µL de solução detergente ácida (0.17% Triton 100X, 0.15 M NaCl, 0.08 N HCl, pH 1.4) por 30 segundos a temperatura ambiente. Então, 1.2 mL da solução final (0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 M ácido cítrico, 0.2 M Na₂HPO₄, pH 6.0) foi adicionado, seguido imediatamente da adição de 10 µL da solução final do corante Laranja de Acridina (0.5 mg/mL). O sinal de 30,000 eventos foi lido depois de 5 minutos de incubação a temperatura ambiente. O índice de fragmentação do DNA (IDF) foi obtido pela razão entre a intensidade da fluorescência vermelha e a fluorescência total.

2.3.3. Integridade da membrana plasmática – teste hiposmótico

O teste hiposmótico (HOST) foi realizado incubando 50 µL de sêmen com 500 µL de solução hiposmótica (Rasul *et al.*, 2000), a 37°C durante 30 minutos. Duzentos espermatozoides por lâmina foram contados, sob aumento de 1000x, em microscópio de contraste de fase. Espermatozoides com caudas enroladas/reagidas foram considerados positivos ao teste.

2.4. Avaliação do perfil proteico do plasma seminal

2.4.1. Eletroforese bi-dimensional (2D SDS-PAGE)

As amostras de plasma seminal foram descongeladas a temperatura ambiente e acrescidas de um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), na proporção 1:100 (Martins *et al.*, 2013). Uma centrifugação a 10,000 g, durante 60 min a 4°C foi realizada para retirar debris celulares. O teor total de proteína solúvel em cada amostra foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) em triplicata, utilizando a albumina sérica bovina como padrão (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Para cada amostra de plasma seminal foi realizada a eletroforese 2D em gel de poliacrilamida como previamente descrito por (Rego *et al.*, 2016), com as modificações a seguir descritas. Alíquotas de cada amostra, contendo 700 µg de proteína foram misturadas em tampão de re-

hidratação (7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 65 mM DTT, 0.5% v/v IPG Buffer pH 3-10 NL, 0.5% v/v CHAPS e traços de azul de bromofenol) totalizando um volume final de 340 µL. Posteriormente, a solução foi aplicada em tiras de gradiente de pH imobilizado de 18 cm - IPG pH 3-10 NL (GE LifeSciences, Piscataway, USA), mantendo-se a incubação por 16 horas, a temperatura ambiente.

A isoeletrofocalização foi conduzida em equipamento Ettan IPGphorII™ (GE LifeSciences) de acordo com a seguinte programação: 100 V (100 Volts hora – Vh), 200 V (600 Vh), 500 V (1,000 Vh), 1,000 V (2,000 Vh), 5000 V (5,000 Vh), 7,000 V (47,000 Vh), totalizando 55,700 Vh. Depois da focalização as tiras foram incubadas por 15 min em tampão de equilíbrio I (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Uréia, 29.3% glicerol, 2% SDS, 1% p/v DTT) e reequilibradas em tampão de equilíbrio II, por mais 15 min (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Uréia, 29.3% glicerol, 2% SDS, 2,5% p/v IAA). Para a eletroforese 2D, as tiras foram posicionadas no topo de géis de poliácridamida a 15% (DALT-Six; GE LifeSciences), e submetidas a 500 V, com 40 mA por gel a 20°C. Depois da corrida SDS-PAGE os géis foram corados usando o método de azul de comassie coloidal (Rego *et al.*, 2016).

2.4.2. Análise das imagens dos géis

Os vinte e quatro géis foram digitalizados com 300 dpi (ImageScanner II; GE LifeSciences) e as imagens salvas em *tagged image file format* (.tiff). As análises das imagens foram realizadas no software PDQuest™ 2-D Analysis, versão 8.0.1 (Bio-Rad, USA) para serem normalizadas e para identificar spots de proteínas diferencialmente expressos entre os grupos de amostras coletadas em cada estação. Os spots de proteínas foram quantificados como partes por milhão do total da intensidade óptica integrada dos spots nos mapas 2D do plasma seminal (Moura *et al.*, 2006).

2.4.3. Identificação das proteínas por espectrômetro de massas com ionização por electrospray acoplado a analisadores quadrupolo e tempo de voo (ESI/Q-ToF)

Foram extraídos dos géis aqueles spots de proteínas presentes de forma consistente em todos os géis, bem como aqueles spots selecionados como diferencialmente expressos entre as amostras coletadas nas duas estações em estudo. Cento e setenta e dois spots foram cortados manualmente dos géis e transferidos para tubos limpos, onde foram lavados três vezes com 400 µL de 50% acetonitrila e 50% bicarbonato de amônio (25 mM a pH 8.8). A seguir os fragmentos de gel foram desidratados com 200 µL de acetonitrila absoluta durante 5 min e secos à temperatura ambiente. Os fragmentos de gel secos foram incubados, durante 20 h a 37°C, em solução contendo tripsina (166 ng/spot). Depois da incubação, os peptídeos foram extraídos com 5% ácido trifluoracético e 50% acetonitrila, por 30 min durante três lavagens. Os extratos foram acondicionados em microtubos e concentrados à vácuo (Eppendorf, Hauppauge, USA).

O procedimento de espectrometria de massas ocorreu como descrito em (Rego *et al.*, 2016). Os peptídeos digeridos foram injetados usando o sistema nanoAcquity e a separação cromatográfica ocorreu em coluna BEH300 C18 (100 µm x 100 mm), com um fluxo de passagem de 600 µL/min (Waters Co., Milford, MA) com gradiente de acetonitrila (5-85%) contendo 0.1% de ácido fórmico. Os espectros de massas foram obtidos no equipamento Synapt HDMS (Waters Co., Milford, MA), operado em modo positivo usando uma fonte de temperatura de 90°C e uma voltagem capilar de 3.5 kV. O procedimento de LC-MS/MS foi realizado utilizando o método de aquisição dependente de dados, no qual um número determinado de picos (dois ou três íons precursores) é selecionado em um espectro de varredura e submetido a outro analisador de massa sequencial.

Os dados foram coletados com o sistema Mass Lynx 4.1 e processados usando o serviço Protein Lynx Global 2.4 (Waters Co.) e então convertidos em arquivos de texto com a lista de picos. Os dados foram submetidos a busca em bancos de dados (NCBI e SwissProt) usando a ferramenta MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). Os critérios utilizados para a busca foram: tripsina como enzima com no máximo uma clivagem perdida, oxidação da metionina como modificação variável, carbamidometilação da cisteína como modificação fixa.

2.4.4. Ontologia gênica e rede de interações proteína-proteína

Todas as proteínas do plasma seminal identificadas com a ferramenta MASCOT foram analisadas pelo aplicativo para pesquisas de anotações de proteínas (STRAP). Os termos para a ontologia gênica associados a processos biológicos e a funções moleculares foram obtidos utilizando o banco de dados livre UniProtKB (Rego *et al.*, 2014).

As proteínas do plasma seminal associadas com a estação de coleta do sêmen foram analisadas usando o banco de dados STRING. A partir dessa análise criou-se a rede de interações proteína-proteína, a partir de associações diretas ou indiretas. Foi utilizada a espécie *Bos taurus* como referência, uma vez que a espécie *Bubalus bubalis* não está disponível no STRING.

2.5. Análise estatística

Os parâmetros seminais avaliados após o descongelamento (parâmetros cinéticos às 0h, queda dos parâmetros cinéticos durante 2h de incubação, viabilidade espermática, integridade funcional da membrana plasmática, índice de fragmentação do DNA), a concentração de proteína total do plasma seminal e a intensidade dos spots de proteína, foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram submetidas a transformação logarítmica e novamente avaliadas quanto a normalidade. As médias das variáveis paramétricas (distribuição normal) foram comparadas entre as estações de coleta pelo teste t de Student não pareado. Aquelas variáveis que não seguiram distribuição normal foram tratadas como não paramétricas e comparadas entre os grupos segundo o teste de Mann-Whitney. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $P < 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas nos softwares GraphPad Prism (v.7; GraphPad software, CA, USA) e SAS (v.9; SAS Inc., USA).

3. Resultados

Os parâmetros de qualidade das amostras de sêmen após o descongelamento e a dosagem do conteúdo de proteína total do plasma seminal estão apresentados na Tabela 2. Após o descongelamento, os parâmetros cinéticos dos espermatozoides avaliados pelo CASA (MP, Rap, VCL, VSL e VAP) e o índice de fragmentação do DNA foram maiores naquelas amostras coletadas durante o inverno. Os parâmetros MT, LIN e BCF, integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e dosagem de proteína total no plasma seminal não diferiram entre as estações de coleta. Quando as amostras foram mantidas a 37°C, durante duas horas, observou-se maior queda da MP e do percentual de espermatozoides rápidos (Rap) nas amostras que foram coletadas durante o inverno.

Tabela 2 – Parâmetros de qualidade do sêmen (média ± erro padrão) após o descongelamento (0h) e após duas horas de incubação a 37°C (representada pelo valor da redução dos parâmetros cinéticos entre 0h e 2h), de ejaculados coletados de touros búfalo, sob regime de criação extensivo, em relação às épocas de coleta do sêmen (inverno X verão).

	0h		Redução na incubação	
	Inverno	Verão	Inverno	Verão
Motilidade progressiva (%; MP)	28.19 ± 5.68 ^a	10.27 ± 3.08 ^b	22.96 ± 4.62 ^a	9.92 ± 2.91 ^b
Motilidade total (%; MT)	47.37 ± 8.05	28.53 ± 6.01	27.18 ± 5.50	24.02 ± 4.69
Espematozoides rápidos (%; Rap)	23.29 ± 5.73 ^a	7.19 ± 2.60 ^b	22.03 ± 5.35 ^a	7.15 ± 2.58 ^b
Velocidade curvilinea (µm/s; VCL)	46.02 ± 3.92 ^a	30.59 ± 3.64 ^b	26.04 ± 3.60	20.51 ± 1.74
Velocidade linear progressiva (µm/s; VSL)	29.75 ± 3.76 ^a	16.84 ± 2.33 ^b	21.49 ± 3.28	14.33 ± 1.66
Velocidade média da trajetória (µm/s; VAP)	34.71 ± 3.96 ^a	21.52 ± 2.71 ^b	22.85 ± 3.67	17.2 ± 1.70
Linearidade (%; LIN)	62.59 ± 5.22	53.63 ± 1.88	24.92 ± 6.19	39.01 ± 3.52
Frequência do batimento flagelar cruzado (Hz; BCF)	9.84 ± 0.75	8.09 ± 0.83	5.44 ± 1.17	6.35 ± 0.61
Íntegro (%; Sybr+/Pi-)	26.19 ± 4.71	18.92 ± 2.69	-	-
Índice de fragmentação do DNA (%)	0.87 ± 0.18 ^a	0.24 ± 0.02 ^b	-	-
Hiposmótico (%; Positivo)	29.50 ± 3.61	28.50 ± 4.06	-	-
Proteína total (µg/µL)	23.27 ± 1.41	26.58 ± 1.63	-	-

Letras diferentes representam diferença estatística entre as épocas, avaliada pelo teste t de Student (P<0.05). Médias não acompanhados de letras não foram diferentes estatisticamente (P>0.05).

Vinte e quatro géis 2D do plasma seminal de touros búfalo foram produzidos e analisados pelo software PDQuest. Na Figura 2 é apresentado o mapa de spots de proteínas gerado pelo software baseado nos spots presentes em todos os géis avaliados, independente da época de coleta da amostra. Foram detectados em média 203.8 ± 9.6 (± SEM) spots de proteínas por gel, sem diferença entre as duas estações de coleta das amostras, quanto ao número de spots detectados (inverno – 221.6 ± 16.57 e verão – 186.0 ± 7.46; P = 0.06).

Com o objetivo de caracterizar o proteoma principal do plasma seminal de búfalos foram excisados 172 spots, que geraram, após a identificação em espectrometria de massas (ESI-Q-Tof), um total de 69 proteínas (Figura 2). A lista completa das proteínas, os dados de espectrometria e peptídeos identificados estão apresentados no Anexo 1. Fazem parte do proteoma do plasma seminal de búfalos proteínas de origem epididimária (proteína secretória do epidídimo E1, lipocalina-5, glutationa peroxidase, entre outras) e aquelas de origem espermática (fosfoglicerato quinase 2, glicose-6 fosfato isomerase, frutose-1,6 bifosfatase, acrosina, proteína de ligação da acrosina, zinco alfa-2 glicoproteína, entre outras).

De acordo com os termos da ontologia gênica, os processos biológicos dos quais faz parte o maior percentual de proteínas identificadas foram os processos celulares, seguido dos processos de regulação, metabólicos e de interação entre células e organismos (Figura 3). As funções moleculares mais relacionadas às proteínas do plasma seminal de búfalos foram de ligação e atividade catalítica (Figura 3).

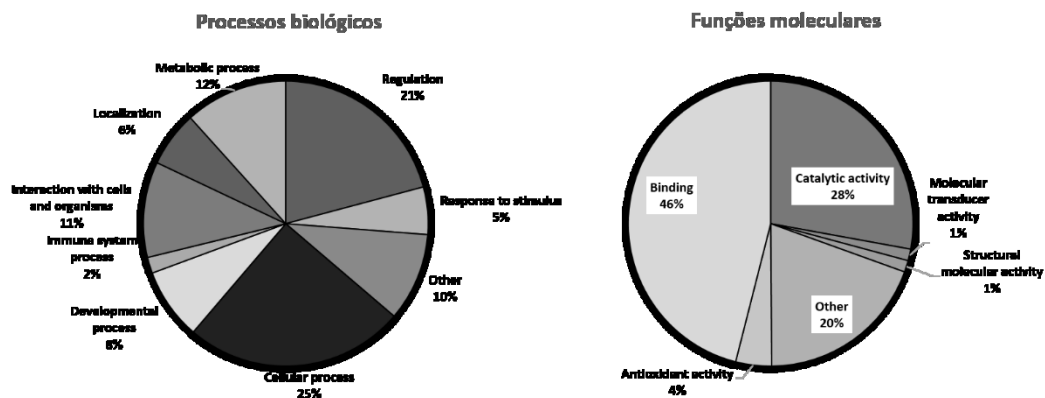


Figura 3 – Processos biológicos e funções moleculares das proteínas identificadas (presentes de forma consistente em todos os 24 géis produzidos no estudo) por espectrometria de massas gerados pelo software STRAP. Os termos da ontologia gênica foram obtidos no banco de dados UniProt.

As intensidades de nove spots de proteínas dos mapas 2D do plasma seminal foram diferentes entre amostras coletadas no inverno e no verão ($P < 0.05$). Esses spots estiveram presentes em todos os géis. Os spots identificados como carboxipeptidase Q e albumina sérica foram mais intensos no inverno. Em contrapartida, os spots identificados como fetuin-B, receptor polimérico de imunoglobulina, proteína ligadora de acrosina, alfa-2 macroglobulina e superóxido dismutase extracelular, foram mais intensamente expressas nos mapas do grupo de amostras coletadas no verão (Tabela 3 e Figura 4).

A análise das interações proteína-proteína, diretas ou indiretas, mostrou ampla variação de interações e sinalizou vias de relação funcional entre as proteínas diferencialmente expressas, e apontou outras proteínas que também se relacionam potencialmente. A Figura 5 apresenta as redes de interação das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a estação de coleta, no plasma seminal de búfalos. A carboxipeptidase Q (CPQ) apresentou interação com 7 outras proteínas, tendo a maioria das interações sido obtida por *text mining*. Para a albumina sérica (ALB) foram preditas 10 proteínas em inter-relação, sendo todas elas vias conhecidas. Uma rede de dez proteínas foi criada para caracterizar as interações do receptor polimérico de imunoglobulina (PIGR), sendo metade das interações conhecidas. Oito e dez proteínas foram envolvidas em vias funcionais com fetuin-B (FETUB) e proteína ligadora de acrosina (ACRBP), respectivamente, sendo as fontes principais *text mining* e co-expressão. Alfa-2 macroglobulina (A2M) foi relacionada com 10 proteínas e mais da metade das interações já foram determinadas experimentalmente, assim como para superóxido dismutase (SOD3) (Figura 5A-G).

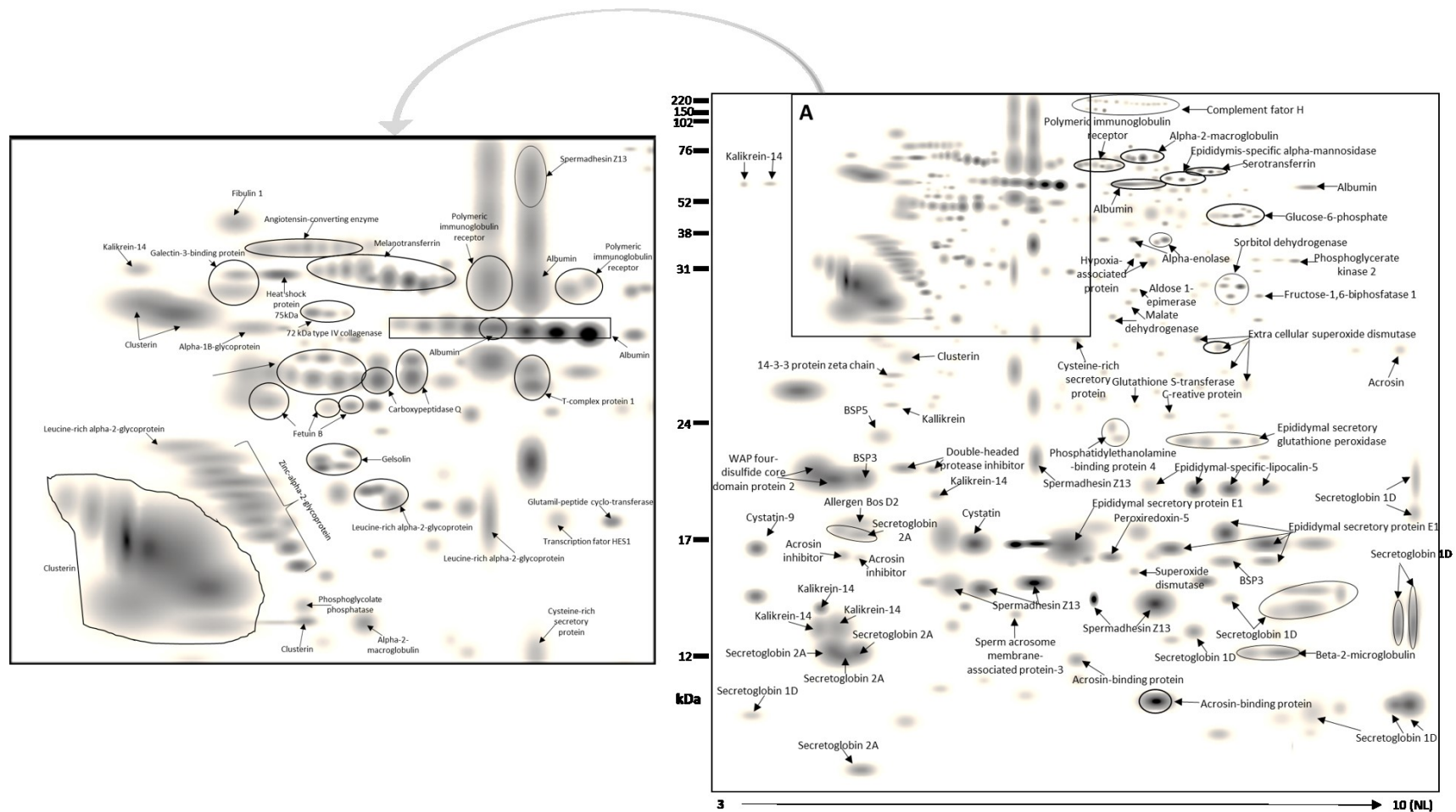


Figura 2 – Mapa bidimensional das proteínas identificadas do plasma seminal de búfalos gerado pelo programa PDQuest (Bio-Rad), baseado na análise dos vinte quatro géis produzidos no estudo (spots consistentemente presentes em todos os géis). A descrição detalhada das proteínas identificadas encontra-se no Anexo 1. As proteínas foram identificadas por eletroforese 2D e espectrometria de massas (ESI-Q-Tof).

Tabela 3 – Proteínas do plasma seminal de búfalos com maior expressão no inverno (CPQ e ALB) e no verão (PIGR, FETUB, ACRBP, A2M e SOD), identificadas por eletroforese 2D e espectrometria de massas (ESI-Q-Tof). Número dos spots se referem à Figuras 3 e ao Anexo 1.

Protein	Experimental kDa/pI	NCBI accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Intensidade de expressão dos spots*
Carboxypeptidase Q					
Spot 57	57.4/5.05	115495837	425	19	0.16%
Serum albumin					
Spot 70	62.9/5.48	594045062	509	29	0.27%
Fetuin B					
Spot 170	42.6/7.44	73587055	285	10	0.03%
Spot 171	42.6/5.77	73587055	207	13	
Spot 172	42.6/5.77	73587055	149	11	
PIGR protein (polymeric immunoglobulin receptor)					
Spot 75	82.5/7.28	151555693	184	15	0.25%
Acrosin binding protein					
Spot 114	10.7/5.05	1888363	30	5	0.26%
Alpha-2 macroglobulin					
Spot 82	72.6/6.76	594093035	1256	26	0.13%
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]					
Spot 155	29.4/7.65	129277510	195	16	0.04%

*Intensidade de expressão dos spots de cada proteína em relação à intensidade total de expressão de todos os spots nos géis de plasma seminal de búfalos, representada em percentual.

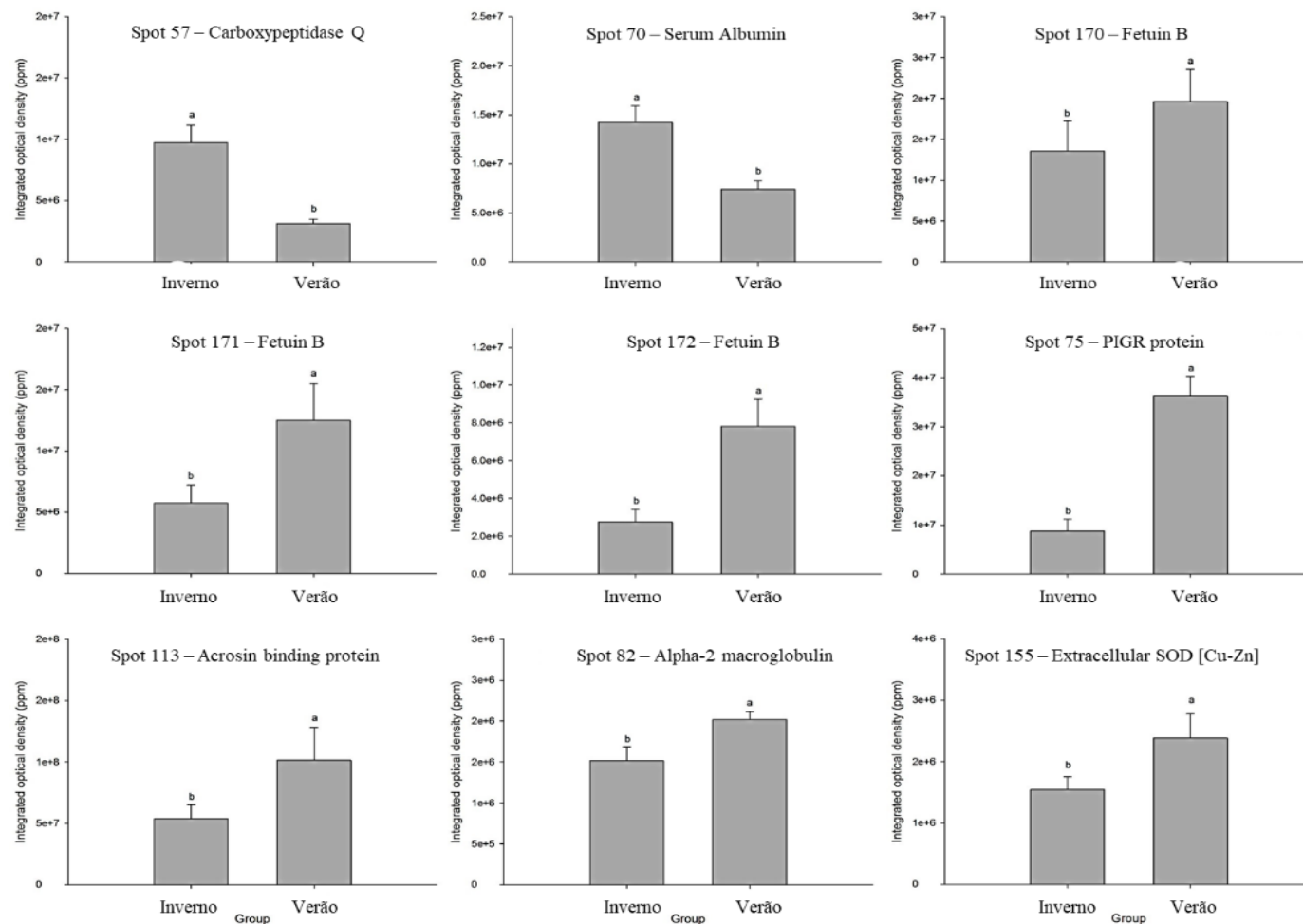


Figura 4 – Diferença na intensidade (média ± SEM) dos spots de proteínas diferencialmente expressas entre as amostras coletadas no inverno e no verão. Número dos spots se referem à Tabela 3 e ao Anexo 1. Letras diferentes mostram intensidades significativamente diferentes pelo teste t (P<0.05).

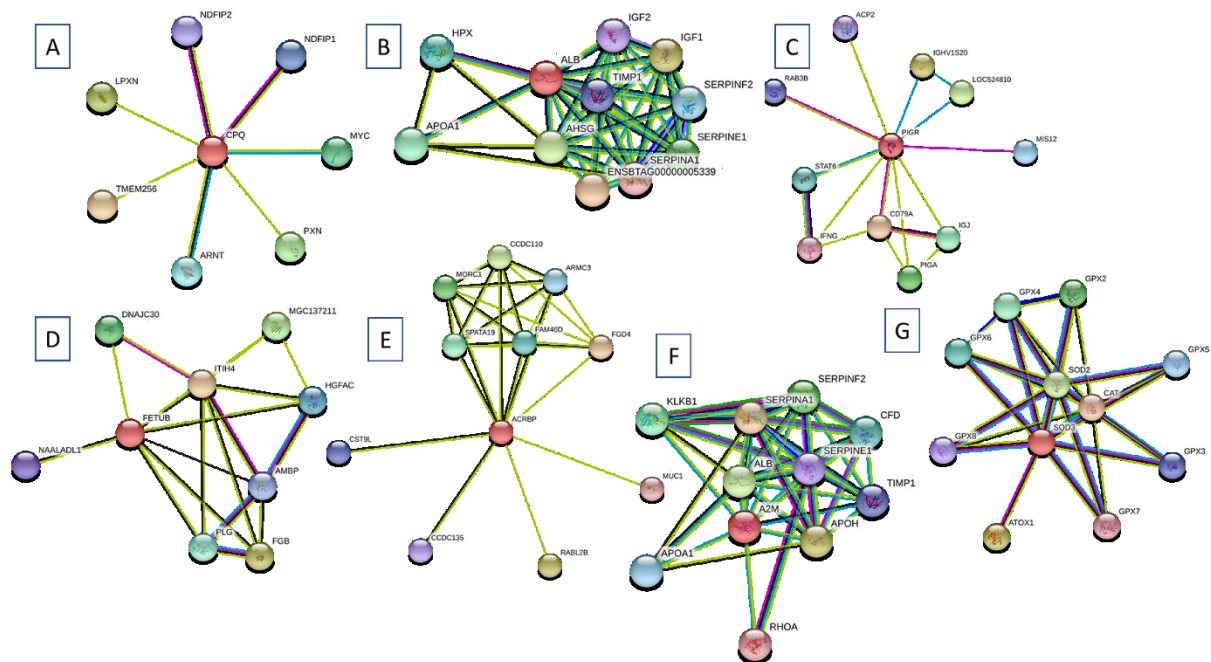


Figura 5 – Rede de interações proteína-proteína das proteínas diferencialmente expressas no plasma seminal coletado no inverno e no verão. A rede foi gerada no software STRING. A: CPQ – carboxipeptidase Q, B: ALB – albumina sérica, C: PIGR – receptor polimérico de imunoglobulina, D: FETUB – fetuin-B, E: ACRBP – proteína ligadora de acrosina, F: A2M – alfa-2 macroglobulin, G: SOD3 – superóxido dismutase extracelular.

*Os traços representam → Interações conhecidas: *azul* – a partir de banco de dados acurados, *roxo* – determinados experimentalmente; Interações previstas: *verde* – por semelhança de gene, *laranja* – por fusão de gene, *azul escuro* – co-ocorrência de gene; Outros: *amarelo* – text mining; *preto* – co-expressão, *cinza* – proteína homóloga.

4. Discussão

4.1. Característica seminais após o descongelamento

O búfalo doméstico é considerado uma espécie sazonal, apesar dos efeitos da estação sobre as características de qualidade seminal e comportamento sexual serem controversos (Andrabi, 2009). Essas variações são muitas vezes atribuídas à latitude do local onde os animais são criados, intensidade das variações climáticas repercutindo na resistência individual, e até o manejo de criação adotado. Em nosso estudo os animais eram da raça Murrah, criados em regime extensivo, estando, portanto, expostos às variações ambientais, em latitude 19°37'04''Sul, clima tropical úmido. Os resultados do cálculo do ITU confirmaram a diferença entre as estações, indicando a possibilidade de um estímulo mais estressante durante o verão, em relação ao inverno. Nessas condições foi possível observar que a resistência ao processo de congelamento dos espermatozoides de búfalos foi consistentemente diferente entre as estações de coleta, com melhores resultados sendo obtidos no inverno (MP, Rap, VCL, VSL e VAP às 0h). Melhor tendência de resistência à criopreservação das amostras de sêmen de búfalos coletadas em épocas de temperatura e umidade mais amenas também foram encontrados por outros autores (Heuer *et al.*, 1987; Bahga e Khokar, 1991; Koonjaenak *et al.*, 2007).

A motilidade progressiva e também as taxas de velocidades calculadas pelo CASA (VCL, VSL e VAP) são apresentadas com alta correlação positiva com as taxas de fertilidade em búfalos (Ahmed *et al.*, 2017). Esses parâmetros retratam indiretamente a capacidade da célula espermática em percorrer longas distâncias em um curto espaço de tempo, aumentando as chances de uma fertilização (Verstergen *et al.*, 2002). Dessa forma, em programas de inseminação artificial desejam-se amostras com altos valores de cinética mesmo após o descongelamento. Entretanto se esses espermatozoides com alta velocidade e progressividade forem incubados *ex situ*, sem que haja uma reposição de substratos, é esperado, nesta condição, que haja uma redução considerável desses parâmetros após longos períodos, refletindo o gasto metabólico, como foi observado no presente estudo (MP e Rap) (Tabela 2).

O processo de criopreservação induz uma série de modificações na membrana plasmática do espermatozoide que resultam, dependendo da resistência individual, em maior ou menor perda de qualidade espermática após o descongelamento. Essa variação é dependente das características do sêmen fresco, não apenas aquelas identificadas pelos testes de qualidade padrão, mas sobretudo aquelas a nível de composição molecular do plasma seminal e do espermatozoide.

A composição do plasma seminal, que irá interagir com o espermatozoide durante a ejaculação e incubação *in vitro*, é determinada principalmente pela secreção das glândulas genitais anexas (Souza *et al.*, 2012), que estão sob controle endócrino dos hormônios esteroides. Os níveis de testosterona plasmático são afetados pelo ambiente externo, via rotas metabólicas que envolvem os hormônios tireoideanos e a prolactina, resultando geralmente em menores concentrações durante estações quentes (Bahga e Khokar, 1991; Mayahi *et al.*, 2014). As mudanças no perfil proteico do plasma seminal identificadas em nosso estudo, podem ter contribuído para as diferentes respostas ao processo de congelamento. Além disso, altos ITU são correlacionados com o aumento da temperatura da superfície escrotal (Ahirwar *et al.*, 2017), o que pode acarretar prejuízos ao processo de espermatogênese e maturação espermática. Esses prejuízos podem não ser percebidos nos parâmetros seminais imediatamente após a coleta (Henry *et al.*, 2017), mas podem refletir em piores respostas ao congelamento (Heuer *et al.*, 1987; Rego *et al.*, 2016).

4.2. Principais proteínas do plasma seminal de búfalos

As proteínas com maior intensidade de expressão no plasma seminal de búfalos nesse experimento, dentre aquelas identificadas, foram as proteínas da família das secretoglobinas (que representaram 25.15% da intensidade total dos spots expressos nos géis) seguidas pelas espermadesinas Z13 (11.69%), clusterinas (6.87%), família das BSP (3.07%), albumina (2.62%) e zinco- α 2-glicoproteínas (0.95%).

No plasma seminal de búfalos foi identificada uma grande intensidade de expressão das proteínas secretoglobina família 2A, também conhecida como mamaglobina, e secretoglobina família 1D, também identificada como lipofilina A. Ambas proteínas pertencem a superfamília das uteroglobinas, proteínas que foram primariamente identificadas no fluido uterino de coelhas. No plasma seminal de humanos, as uteroglobinas foram relacionadas como fatores decapacitantes e aparentemente com efeito negativo sobre a motilidade (Luconi *et al.*, 2000).

A maioria das proteínas componentes da família das espermadesinas são encontradas associadas à superfície do espermatozoide ejaculado, desempenhando funções no processo geral de fertilização (Reinert *et al.*, 1996). Porém, a proteína espermadesina Z13 em ruminantes, não é encontrada associada ao espermatozoide (Tedeschi *et al.*, 2000). Sua função biológica parece estar

associada a regulação da atividade mitocondrial, de forma dose dependente e reversível. Altas concentrações de Z13 no plasma seminal foram associadas a baixas motilidade espermática e fertilização *in vivo*, em bovinos (Moura *et al.*, 2006).

As clusterinas são glicoproteínas sulfatadas, presentes em diferentes espécies de mamíferos (Ibrahim *et al.*, 2001). A clusterina está envolvida numa série de eventos biológicos, que vão desde sua ação testicular durante a espermatogênese, até as funções desempenhadas no sêmen relacionadas a proteção espermática.

Por ser uma molécula anfipática, a clusterina se liga aos componentes do sistema complemento (C5b-6), de maneira dose-dependente e reversível, evitando sua inserção dentro da membrana plasmática e a consequente lise celular (Meri e Jarva, 2001). É também proposto um papel de chaperona, uma vez que utilizando a energia da hidrólise do ATP consegue induzir a destruição de células morfologicamente anormais, evitando a precipitação dessas células (Humphreys *et al.*, 1999). Talvez esse seja o motivo pelo qual altas concentrações de clusterina são encontradas em plasma seminal de touros com alto índice de anormalidades espermáticas (Ibrahim *et al.*, 2001).

Uma família de proteínas altamente conservada no plasma seminal de mamíferos, denominada proteínas de ligação ao espermatozoide (*Binder of SPerm proteins – BSP*), é a mais estudada desde sua primeira identificação em plasma seminal de bovino, ocorrida na década de 80 (revisado por Plante *et al.*, 2016). De forma geral, são proteínas conhecidas por sua capacidade de ligação à fosfolípidos, gelatina e heparina estando, portanto, envolvidas na estabilização da membrana plasmática e capacitação dos espermatozoides (Manjunath e Thérien, 2002).

Em bovinos três tipos de proteínas BSP, de origem das glândulas vesiculares, foram melhor caracterizadas, e representam 40-57% do total da fração proteica do plasma seminal: BSP1, BSP3 e BSP5 (Nauc e Manjunath, 2000). A relação de expressão dessas três proteínas no plasma seminal de bovinos é de 10:1:1, respectivamente para BSP1, BSP3 e BSP5 (Nauc e Manjunath, 2000).

No presente estudo não foi possível a identificação da proteína BSP1 no plasma seminal de búfalos, tendo sido identificadas apenas as proteínas BSP3 e BSP5. Além disso, a intensidade de expressão dos spots dessas proteínas, em relação à intensidade total dos spots dos géis, representou aproximadamente 3.1% apenas. De forma similar ao encontrado em nosso estudo, Arangasamy *et al.* (2005) também obtiveram baixa predominância desse grupo de proteínas, apenas 9,7% das proteínas totais do plasma seminal de búfalos. Além disso, uma inversão da razão de predominância dos tipos de BSP no plasma seminal de búfalos foi relatada por Shende *et al.* (2015). A expressão de proteínas BSP3 foi maior em relação aos outros dois tipos de BSP, sendo a razão proposta de 10:18:1, para BSP1, BSP3 e BSP5 respectivamente.

A albumina também desempenha funções de proteção espermática ao se ligar ao óxido nítrico e outros peróxidos, reduzindo a peroxidação lipídica das membranas celulares (Alvarez e Storey, 1995).

As zinco- α 2-glicoproteínas encontradas no plasma seminal são ditas de origem do espermatozoide, uma vez que se ligam a ele durante a maturação epididimária. Sua presença é envolvida na manutenção dos níveis de AMPc intracelular, fosforilação de proteínas e concentração de cálcio (Liu *et al.*, 2012). Esses processos são essenciais para a motilidade espermática e reação acrosomal. No plasma seminal de ovinos, a zinco- α 2-glicoproteína causa um aumento inicial da motilidade espermática, porém após tempo prolongado de incubação em

temperatura de resfriamento (24 horas) ela é negativamente associada a motilidade (Soleilhavoup *et al.*, 2014).

4.3. Proteínas diferencialmente expressas de acordo com a estação

Nas amostras coletadas durante o inverno houve maior intensidade de expressão das proteínas carboxipeptidase Q (CPQ), também conhecida como glutamato carboxipeptidase, e albumina (ALB), coincidindo com os melhores resultados de cinética espermática após descongelamento (MP, Rap, VCL, VSL e VAP). As peptidases seminais, como a CPQ, afetam a função espermática por clivar resíduos de peptídeos da membrana do espermatozoide, participando durante a capacitação espermática (Souza *et al.*, 2012). Uma outra função possível para as aminopeptidases é a participação nos processos de reação acrosomal (Togo e Morisawa, 2004), reafirmado pela identificação de CPQ associado à membrana plasmática de espermatozoides ovinos (Van Tilburg *et al.*, 2013). A ALB também tem sido associada ao processo de capacitação espermática, por auxiliar na remoção do colesterol da membrana plasmática (Flesch e Gadella, 2000), assim como com nos mecanismos de proteção contra a peroxidação lipídica dos espermatozoides (Alvarez e Storey, 1995). Touros bovinos com alta expressão de albumina no plasma seminal apresentaram melhores índices de fertilidade (Muhammad Aslam *et al.*, 2014). Hipóteses sobre a relação direta dessas proteínas e a cinética espermática não foram encontradas.

Mudanças no padrão de expressão de proteínas no plasma seminal coletado no inverno foi também relatado por Nandre *et al.* (2013), em estudo realizado com búfalos da raça Surti criados na Índia. Nesse trabalho, entretanto, foram identificadas as proteínas fosfoglicerato cinase, proteína reguladora de andrógeno, inibidor de ribonuclease e sorbitol desidrogenase, como as mais expressas no inverno.

Fetuin-B (FETUB), também conhecida como alpha 2-HS-glicoproteína, é uma proteína plasmática não hormonal com função de inibidor competitivo e reversível de cisteíno-proteases. É uma proteína primariamente sintetizada pelo fígado, e integra a superfamília das cistatinas (Olivier *et al.*, 2000). As proteínas do tipo fetuin (A e B) estão envolvidas em várias vias metabólicas essenciais, incluindo osteogênese, reabsorção óssea e absorção de glicose pelas células musculares (Olivier *et al.*, 2000; Skibieli *et al.*, 2018), além de respostas a inflamação aguda (Figura 5). Mais recentemente foi comprovada a ação fundamental da fetuin-B durante a interação espermatozoide-oócito. A fetuin-B, presente no fluido folicular e no espaço perivitelino, age antagonicamente a enzima ovastacin, evitando a clivagem prematura da proteína ZP2 e assim evitando o enrijecimento da zona pelúcida antes da fertilização (Dietzel *et al.*, 2013). Não foram encontradas informações disponíveis sobre o papel da fetuin-B no trato reprodutivo masculino de mamíferos, apesar de essa proteína já ter sido identificada no plasma seminal de ovinos (Souza *et al.*, 2012; Druart *et al.*, 2013), no fluido testicular de ovinos (Van Tilburg *et al.*, 2017) e ligada ao espermatozoide de bovinos (Defaus *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, a fetuin-B foi significativamente mais expressa no plasma seminal de búfalos coletado durante o verão. Essa estação foi caracterizada por maiores temperatura e umidade, gerando um ITU que sugere um possível desconforto térmico moderado. Em situações de estresse térmico, ruminantes podem apresentar redução de consumo com conseqüente alteração do metabolismo hepático. Nessa situação há maior secreção de fetuin-B pelos hepatócitos (Skibieli *et al.*, 2018). Em nossa situação experimental um desbalanço energético transitório durante o verão pode ter resultado em uma maior concentração de fetuin-B sérica, refletindo em maior concentração dessa proteína no plasma seminal.

Em plasma seminal de peixes, foi relatada a presença de uma proteína similar a fetuin-B, chamada Inibidor I, de origem sanguínea, que também exerceria função de inibidor de serino proteases. Os autores sugerem uma ação inibidora sobre a motilidade espermática (Nynca *et al.*, 2011). Essa última hipótese estaria de acordo com os achados do nosso estudo, no qual as amostras coletadas no verão, portanto com maior intensidade de expressão de fetuin-B, apresentaram pior motilidade progressiva após o descongelamento. Entretanto, a adição de fetuin (de origem do soro fetal bovino) ao diluidor de congelamento de sêmen de bovinos, resultou em uma melhoria dos parâmetros espermáticos após descongelamento, mas de forma dose dependente (Sariözkan *et al.*, 2015). Mais estudos são necessários para esclarecer a função e o modo de ação dessa proteína na fisiologia espermática de cada espécie.

O receptor polimérico de imunoglobulinas (PIGR), também chamado de componente secretório por alguns autores, é uma proteína transmembrana que se liga a imunoglobulina A, transpondo-a através da membrana plasmática e secretando-a na superfície apical da célula (Cunningham *et al.*, 2008). A imunoglobulina A tem origem na próstata em humanos e na glândula uretral em roedores (Beagley *et al.*, 1998). As funções desempenhadas pelas imunoglobulinas no trato reprodutivo masculino são similares aquelas encontradas em outras mucosas, envolvendo prevenção da adesão de microrganismos e outros mecanismos de defesa (Russell e Mestecky, 2002). No proteoma do plasma seminal de búfalos houve maior expressão de PIGR nas amostras coletadas no verão, coincidindo os piores parâmetros seminais pós-descongelamento. De forma semelhante, (Soleilhavoup *et al.*, 2014; Rickard *et al.*, 2015) associaram a expressão dessa proteína em plasma seminal de ovinos com uma pior resposta ao processo de resfriamento ou congelamento seminal. Os mecanismos pelos quais um aumento de PIGR no plasma seminal interfere com a resistência à criopreservação não estão claros, mas devem envolver um tempo de ligação prolongado das imunoglobinas-A aos espermatozoides (Swegen *et al.*, 2015).

A proteína ligadora de acrosina (ACRBP) origina-se da matriz acrosomal do espermatozoide (Baba *et al.*, 1994). A maior expressão de proteína ligadora de acrosina no plasma seminal coletado no verão nesse estudo indica então um maior número de espermatozoides com dano acrosomal no sêmen fresco, o que resultou na menor resistência ao processo de congelamento observado (Rego *et al.*, 2016). Igualmente, maiores concentrações de ACRBP foram encontradas no plasma seminal de ovinos com baixa resistência espermática ao congelamento (Rickard *et al.*, 2015). Quando expresso no proteoma espermático, a ACRBP foi predita como um marcador de boa congelabilidade do sêmen de suínos. Em maiores concentrações a proteína ligadora no espermatozoide retardaria a liberação da acrosina prevenindo a capacitação prematura resultante do processo de criopreservação (Vilagran *et al.*, 2013).

Dentre as proteases e antiproteases presentes no plasma seminal a α 2-macroglobulina (A2M) é considerada um potente inibidor de protease de amplo espectro, e ainda capaz de se ligar a citocinas e hormônios em suspensão (Glander *et al.*, 1996). É uma proteína sintetizada pelas células de Sertoli, sob controle de FSH, e parece agir no ambiente epididimário evitando clivagens proteicas indesejadas (Peloille *et al.*, 1997).

A rede de interações construída para a A2M mostrou que as principais proteínas que estabelecem interações funcionais são inibidoras de serino proteases (Figura 5). Dessa forma, sugerimos que a função sobre a motilidade espermática, descrita para inibidores de protease do plasma seminal, também possa ser similarmente atribuída à A2M. Os inibidores de protease do plasma seminal mantêm altos valores de motilidade espermática do sêmen ejaculado, mesmo após tempo prolongado de incubação, por prevenirem a degradação da adenilato ciclase mantendo altos níveis de AMPc intra-celular (Okamura *et al.*, 1990). Um desgaste metabólico acentuado pré-

congelamento pode ter sido a causa dos piores índices do padrão de motilidade após o descongelamento obtidos nas amostras de sêmen de búfalos coletadas durante o verão, que apresentaram maior intensidade de expressão da A2M. Essa inferência, no entanto, necessita de mais estudos para ser comprovada. Em adição aos resultados encontrados em nosso estudo, uma associação negativa da expressão de A2M com características pós-descongelamento também foi encontrada em sêmen de bovinos (Rego *et al.*, 2016). A razão pela qual os maiores valores de temperatura e umidade poderiam ter provocado a maior expressão dessa proteína no plasma seminal de búfalos permanece inconclusiva.

Condições ambientais que provoquem algum grau de desconforto ao animal, como aquelas manifestadas durante o verão em climas tropicais, podem provocar comprometimento da função testicular, do epidídimo e das glândulas acessórias, por alterar, entre outros mecanismos, a secreção de testosterona (Malfatti *et al.*, 2006). Outro mecanismo que ocorre nessas condições é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que pode levar a um prejuízo da qualidade do sêmen. Para contrabalancear o aumento da produção de ROS, ocorre aumento concomitante de fatores antioxidantes do sêmen (Sharma *et al.*, 2016). A superóxido dismutase [Cu-Zn] (SOD3) é uma metaloproteína integrante do sistema antioxidante enzimático do sêmen, que está presente tanto intracelular como extracelular. Ela é responsável por catalisar a reação dos ânions superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio, protegendo o espermatozoide contra o acúmulo do ânion superóxido (Mruk *et al.*, 2002). Além da função de proteção contra o dano oxidativo, a SOD tem sido relacionada ao estímulo de fosforilação da tirosina e com eventos associados ao início da capacitação (Dacheux *et al.*, 2005).

O aumento das concentrações de SOD associado a estação de verão, como encontramos em nosso estudo, foi também descrita no plasma seminal de búfalos criados na Índia (Sharma *et al.*, 2016), e para espermatozoides de suínos (Argenti *et al.*, 2018). A maior concentração de SOD no plasma seminal dos búfalos coincidiu com o menor índice de fragmentação do DNA, encontrado após o descongelamento do sêmen coletado no verão. A proteção contra a oxidação do DNA provocada pela ação dos ROS é uma das funções conhecidas da SOD (Mruk *et al.*, 2002). Contudo, os resultados inferiores do padrão cinético dos espermatozoides congelados no verão, constituem-se em um paradoxo que requerem estudos mais profundos. Eghbali *et al.* (2008) associaram o aumento de SOD extracelular ao maior número de células espermáticas danificadas na amostra recém coletada, que resultou em menor motilidade do espermatozoide de búfalos. Esses achados não puderam ser confirmados em nosso estudo.

5. Conclusão

Em conclusão, esse estudo mostrou que existe uma associação da estação e a resistência ao processo de congelamento dos espermatozoides de búfalos, criados em regime extensivo, sob clima tropical úmido. O sêmen coletado no inverno apresentou características cinéticas pós-descongelamento (MP, Rap, VCL, VSL e VAP) superiores ao sêmen coletado e congelado no verão. Adicionalmente foi demonstrada a maior da expressão de proteínas no plasma seminal coletado no inverno (CPQ e ALB) ou no verão (FETUB, PIGR, ACRBP, A2M e SOD3). Por fim, o mapa de proteínas 2D e as principais proteínas expressas do plasma seminal de búfalos foram apresentados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas é essencial para se alcançarem melhores produtividade e eficiência do sistema de criação animal. A espécie bubalina, adotada como alternativa a produção de proteína de origem animal de alta qualidade nutricional, foi nesse trabalho de conclusão explorada quanto a fisiologia espermática. As abordagens experimentais apresentadas permitiram identificar mudanças da qualidade espermática de búfalos, principalmente após o processo de congelamento/descongelamento, decorrentes de interferências ambientais externas. Entretanto, não foi possível identificar um padrão fixo de sazonalidade quanto a estação do ano (inverno ou verão).

O que se nota é que as condições climáticas, mesmo dentro de um microclima, podem variar de um ano para outro, e assim se alternarem as dominâncias de efeitos sobre a fisiologia espermática dos animais. Portanto, a capacidade adaptativa individual do rebanho às condições ambientais parece ser a característica mais predominante a ser avaliada dentro de cada sistema de criação, visando o maior desempenho reprodutivo.

Aliado a característica nutricional, a capacidade de termorregulação corporal e testicular são afetadas pelas condições bioclimáticas. Diferente de um padrão esperado, devido provavelmente a forma predominante da troca de calor da espécie bubalina (por condução), grandes quantidades de chuva no período podem ajudar na perda de calor proporcionando menor desconforto térmico aos animais, e assim melhor qualidade seminal. Esse pode ter sido um grande influenciador da melhor resposta ao processo de congelamento das amostras de sêmen coletadas no verão do ano 2. Quando a diferença da quantidade de chuvas (e conseqüentemente de umidade) entre inverno e verão, apesar de significativa, não é tão grande, pode ocorrer certo desconforto pela dificuldade de termólise, como observado no ano 1.

Além disso, mostrou-se que mudanças sazonais também são percebidas na constituição proteica do plasma seminal de búfalos, incluindo expressão diferencial de algumas proteínas que já foram anteriormente relacionadas ao processo de congelamento ou de fertilidade, em outras espécies mamíferas.

Apesar de nem todas as características funcionais das proteínas seminais serem conhecidas, algumas relações nos permitiram perceber que as condições climáticas desfavoráveis podem aumentar a expressão de proteínas indesejáveis durante a criopreservação. Essas proteínas podem ser utilizadas como marcadores moleculares durante a seleção de ejaculados antes dos procedimentos de congelamento. Por outro lado, proteínas que tenham efeitos positivos sobre o processo de congelamento, podem ser empregadas como marcadores e até adicionadas em meios diluidores usados no congelamento das células, em diferentes etapas do processo.

Resultados importantes foram encontrados, porém permanece a necessidade de novos estudos, com diferentes abordagens, para que seja possível maximizar as tecnologias reprodutivas artificiais e assim estimular o crescimento da bubalinocultura no Brasil e no mundo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIRWAR, MANEESH KUMAR; KATAKTALWARE, MUKUND AMRITRAO; RAMESHA, KEREKOPPA PUTTAIAH; *et al.* Influence of season, age and management on scrotal thermal profile in Murrah bulls using scrotal infrared digital thermography. *International Journal of Biometeorology*, v. 61, p. 2119–2125, 2017.
- AHMAD, N.; SHAHAB, M.; KHURSHID, S.; *et al.* Pubertal development in the male buffalo: Longitudinal analysis of body growth, testicular size and serum profiles of testosterone and oestradiol. *Animal Reproduction Science*, v. 19, n. 3–4, p. 161–170, 1989.
- AHMAD, N.; UMAIR, S.; SHAHAB, M.; *et al.* Testicular development and establishment of spermatogenesis in Nili-Ravi buffalo bulls. *Theriogenology*, v. 73, n. 1, p. 20–25, 2010.
- AHMED, H.; ANDRABI, S. M.H.; ANWAR, M.; *et al.* Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. *Andrologia*, v. 49, n. 4, p. 1–6, 2017.
- ALKAFIFY, MOHAMED; ELNASHARTY, MOHAMED; SAYED-AHMED, AHMED; *et al.* Immunohistochemical studies of the epididymal duct in Egyptian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Acta Histochemica*, v. 113, n. 2, p. 96–102, 2011.
- ALVAREZ, JUAN G.; STOREY, BAYARD T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 42, n. 3, p. 334–346, 1995.
- ANDRABI, S M H. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*, v. 44, n. 3, p. 552–569, 2009.
- ARANGASAMY, A.; SINGH, L. P.; AHMED, N.; *et al.* Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 90, n. 3–4, p. 243–254, 2005.
- ARGENTI, L. E.; PARMEGGIANI, B. S.; LEIPNITZ, G.; *et al.* Effects of season on boar semen parameters and antioxidant enzymes in the south subtropical region in Brazil. *Andrologia*, n. November 2017, p. e12951, 2018.
- ASADPOUR, R.; ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; REZAI, S. ASRI; *et al.* SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Animal Reproduction Science*, v. 102, n. 3–4, p. 308–313, 2007.
- AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v. 46, n. 5, p. 791–797, 1996.
- BABA, TADASHI; NIIDA, YASUSHI; MICHIKAWA, YUICHI; *et al.* An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 13, p. 10133–10140, 1994.
- BAHGA, C.S.; KHOKAR, B.S. Effect of different seasons on concentration of plasma luteinizing-hormone and seminal quality vis-a-vis freezability of buffalo bulls. *International Journal of Biometeorology*, v. 35, n. 4, p. 222–224, 1991.

- BARILE, V. L. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. *Livestock Production Science*, v. 92, n. 3, p. 183–194, 2005.
- BARNABE, RENATO C; BARNABE, VALQUIRIA H; OLIVEIRA, CLAUDIO A; *et al.* Biochemical study of semen of buffaloes. I. Determinations of fructose, calcium, GOT and GPT. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 30, n. 1, p. 43–45, 1993.
- BARRETO FILHO, J. B.; MELO, M. I. V.; LAGE, A. P.; *et al.* Buffalo (*Bubalus bubalis*) sexual development: endocrinological and testicular histological aspects. II. From 10 to 24 months of age. *Buffalo bulletin*, v. 15, n. 2, p. 42–44, 1996.
- BARROS, DANIEL VALE; SILVA, LILIAN KÁTIA XIMENES; DE BRITO LOURENÇO, JOSÉ; *et al.* Evaluation of thermal comfort, physiological, hematological, and seminal features of buffalo bulls in an artificial insemination station in a tropical environment. *Tropical Animal Health and Production*, v. 2011, p. 805–813, 2015.
- BATRUCH, IHOR; LECKER, IRENE; KAGEDAN, DANIEL; *et al.* Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *Journal of Proteome Research*, v. 10, n. 3, p. 941–953, 2011.
- BEAGLEY, K W; WU, Z L; POMERING, M; *et al.* Immune responses in the epididymis: implications for immunocontraception. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v. 53, n. May 2014, p. 235–45, 1998.
- BEER-LJUBIĆ, B.; ALADROVIĆ, J.; MARENJAK, T. S.; *et al.* Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology*, v. 72, n. 8, p. 1132–1140, 2009.
- BHAKAT, M; MOHANTY, T K; GUPTA, A K; *et al.* Act of season on semen quality parameters in murrh buffalo bulls. *Buffalo bulletin*, v. 34, n. 1, p. 100–112, 2015.
- BORGHESE, ANTONIO. *Buffalo production and research*. Roma: [s.n.], 2005. v. 67.
- BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRITO, LEONARDO F.C.; SILVA, ANTONIO E.D.F.; BARBOSA, ROGERIO T.; *et al.* Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: Relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology*, v. 61, n. 2–3, p. 511–528, 2004.
- BRONSON, F. H. Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, n. 1534, p. 3331–3340, 2009.
- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; RAATH, J. R.; *et al.* Impact of season on seminal characteristics and endocrine status of adult free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*). *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 92, n. 1, p. 47–57, 1991.
- CANCEL, A M; CHAPMAN, D A; KILLIAN, G J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biology of reproduction*, v. 57, n. 6, p. 1293–1301, 1997.

- CARDOZO, J. A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; *et al.* Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, v. 66, n. 4, p. 841–850, 2006.
- CASTRO, S R S; MORINI, A C; SILVA, A S L; *et al.* Influence of Seasonality on Buffalo Semen. *Animal and Veterinary Sciences*, v. 5, n. 3, p. 45–51, 2017.
- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. [S.l: s.n.], 2013.
- CHACUR, M G M; MARTINS, E A F; SILVA, A A; *et al.* Morfometria corpórea, características do sêmen, proteínas seminais e testosterona em cervos *Cervus unicolor*, em cativeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 5, p. 1392–1400, 2014.
- CHOCU, SOPHIE; CALVEL, PIERRE; ROLLAND, ANTOINE D.; *et al.* Spermatogenesis in mammals: Proteomic insights. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v. 58, n. 4, p. 179–190, 2012.
- COM, EMMANUELLE; MELAINE, NATHALIE; CHALMEL, FREDERIC; *et al.* Proteomics and integrative genomics for unraveling the mysteries of spermatogenesis: the strategies of a team. *Journal of Proteomics*, v. 107, p. 128–143, 2014.
- COSTA, KATIA APARECIDA DE PINHO; ROSA, BENEVAL; OLIVEIRA, ITAMAR PEREIRA DE; *et al.* EFEITO DA ESTACIONALIDADE NA PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA E COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DA *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Ciência Animal Brasileira*, v. 6, n. 3, p. 187–193, 2005.
- CUNNINGHAM, KELLY A.; CAREY, ALISON J.; FINNIE, JANE M.; *et al.* Poly-Immunoglobulin receptor-mediated transport of IgA into the male genital tract is important for clearance of chlamydia muridarum infection. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 60, n. 5, p. 405–414, 2008.
- DA LUZ, PATRÍCIA A.C.; ANDRIGHETTO, CRISTIANA; SANTOS, PAULO R.S.; *et al.* Daily sperm production and evaluation of morphological reproductive parameters of Murrah buffaloes in an extensive breeding system. *Spermatogenesis*, v. 2, n. 2, p. 88–93, 2012.
- DACHEUX, JEAN LOUIS; CASTELLA, SANDRINE; GATTI, JEAN LUC; *et al.* Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v. 63, n. 2 SPEC. ISS., p. 319–341, 2005.
- DACHEUX, JEAN LOUIS; DACHEUX, FRANÇOISE. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, v. 147, n. 2, 2014.
- DEFAUS, SIRA; AVILÉS, MANUEL; ANDREU, DAVID; *et al.* Identification of Bovine Sperm Surface Proteins Involved in Carbohydrate-mediated Fertilization Interactions. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 15, n. 7, p. 2236–2251, 2016.
- DEL OMO, E; BISBAL, A; GARCÍA-ALVAREZ, O; *et al.* Free-radical production after post-thaw incubation of ram spermatozoa is related to decreased in vivo fertility. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, n. 8, p. 1187–1196, 2015.
- DI FRANCESCO, SERENA. *Effect of season on reproductive performances in buffalo species (Bubalus bubalis)*. 2010. 166 f. Università Degli Studi di Napoli Federico II, 2010.
- DIETZEL, EILEEN; WESSLING, JENNIFER; FLOEHR, JULIA; *et al.* Fetuin-B, a liver-derived

- plasma protein is essential for fertilization. *Developmental Cell*, v. 25, n. 1, p. 106–112, 2013.
- DIVYASHREE, B. C.; ROY, SUDHIR C. Species-specific and differential expression of BSP-5 and other BSP variants in normozoospermic and asthenozoospermic buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos taurus*) seminal plasma. *Theriogenology*, v. 106, p. 279–286, 2018.
- DIXIT, N.K.; AGARWAL, S.P.; AGARWAL, V.K. Seasonal variations in serum levels of thyroid hormones and their relation with seminal quality and libido in buffalo bulls. *Theriogenology*, v. 22, n. 5, p. 497–507, 1984.
- DRUART, X.; RICKARD, J. P.; MACTIER, S.; *et al.* Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics*, v. 91, p. 13–22, 2013.
- DUNCAN, MARK W; THOMPSON, HEATHER S. Proteomics of semen and its constituents. p. 861–875, 2007.
- EGHBALI, M; ALAVI-SHOUSHTARI, S M; ASRI REZAI, S. Effects of cooper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pakistan Journal of biological sciences*, v. 11, n. 15, p. 1964–1968, 2008.
- EGHBALI, MAHDI; ALAVI-SHOUSHTARI, SAYED MORTAZA; ASRI-REZAEI, SIAMAK; *et al.* Calcium , Magnesium and Total Antioxidant Capacity (TAC) in Seminal Plasma of Water Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Bulls and their Relationships with Semen Characteristics. *Veterinary Research Forum*, v. 1, n. 1, p. 12–20, 2010.
- EVENSON, D; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science*, v. 22, p. 169–189, 2000.
- FARRELL, P B; PRESICCE, G A; BROCKETT, C C; *et al.* Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v. 49, n. 4, p. 871–879, 1998.
- FERNANDEZ-GAGO, R; DOMINGUÉZ, J C; MARTINEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*, v. 80, n. 4, p. 400–410, 2013.
- FERRER, AYMÉE; MONTES, INEIDA; ALCALÁ, Y. Influencia de la época del año en las características del semen fresco del búfalo de agua. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, v. 4, n. 1, p. 53–58, 2010.
- FLESCHE, FRITS M.; GADELLA, BAREND M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, v. 1469, n. 3, p. 197–235, 2000.
- FRANÇA, LUIS RENATO; AVELAR, GLEIDE F.; ALMEIDA, FERNANDA F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v. 63, p. 300–318, 2005.
- FRASER, L R; UMAR, G; SAYED, S. Na⁺ - requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 97, p. 539–549, 1993.
- GARCIA, ALEXANDRE ROSSETTO. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). *Revista de Ciências Agrárias*, v. 45, p. 1–13,

2006.

GEORGIEV, G H. Activity of Sorbitol Dehydrogenase Plasma in Ram ' S and Bull ' S Seminal. v. 5, p. 21–23, 1974.

GILANY, KAMBIZ; MINAI-TEHRANI, ARASH; SAVADI-SHIRAZ, ELHAM; *et al.* Exploring the Human Seminal Plasma Proteome : An Unexplored Gold Mine of Biomarker for Male Infertility and Male Reproduction Disorder. v. 16, n. 2, p. 61–71, 2015.

GLANDER, H J; KRATZSCH, J; WEISBRICH, C; *et al.* Insulin-like growth factor-I and alpha 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. *Human Reproduction*, v. 11, n. 11, p. 2454–2460, 1996.

GONÇALVES, ARNALDO ALGARANHAR; GARCIA, ALEXANDRE ROSSETTO; DE ARRUDA, RUBENS PAES; *et al.* A suplementação alimentar com ácidos graxos insaturados melhora a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*) pós descongelamento. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 5, p. 2467–2484, 2014.

HARAYAMA, HIROSHI; MINAMI, KENTA; KISHIDA, KAZUMI; *et al.* Protein biomarkers for male artificial insemination subfertility in bovine spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 16, n. 2, p. 89–98, 2017.

HARSHAN, HIRON M.; SANKAR, SURYA; SINGH, L. P.; *et al.* Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, v. 115, n. 1–4, p. 306–311, 2009.

HARSHAN, HIRON M.; SINGH, L. P.; ARANGASAMY, A.; *et al.* Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 93, n. 1–2, p. 124–133, 2006.

HENRY, MARC; BRITO, MAYARA FERREIRA; NEVES, BEATRIZ PARZEWSKI; AULER, PATRÍCIA A; ALMEIDA, JACI; VETERINÁRIA, ESCOLA DE; *et al.* Exame andrológico de bubalinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 41, n. 1, p. 188–194, 2017.

HENRY, MARC; BRITO, MAYARA FERREIRA; NEVES, BEATRIZ PARZEWSKI; AULER, PATRÍCIA ALENCAR; ALMEIDA, JACI; ANDRADE, GUILHERME OLIVEIRA; *et al.* Peculiarities of the buffalo species for andrological evaluation results of four years of study and weekly semen collection schedule. *Animal Reproduction*, v. 14, n. Suppl. 1, p. 1125–1233, 2017.

HEUER, C; TAHIR, M N; AMJAD, H. Effect of season on fertility of frozen buffalo semen. *Animal Reproduction Science*, v. 13, p. 15–21, 1987.

HUANG, YU-LIN; FU, QUIANG; HONG, PAN; *et al.* Spermatogenesis - associated proteins at different developmental stages of buffalo testicular seminiferous tubules identified by comparative proteomic analysis . PubMed Commons. *Proteomics*, v. 16, n. 14, p. 2005–2018, 2016.

HUMPHREYS, DAVID T.; CARVER, JOHN A.; EASTERBROOK-SMITH, SIMON B.; *et al.* Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 11, p. 6875–6881, 1999.

HUNT, CURTISS D; JOHNSON, PHYLLIS E; HERBEL, JOLAYANE; *et al.* Effects of dietary zinc depletion on seminal volume and zinc loss, serum testosterone concentrations, and sperm morphology in young men. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, p. 148–157, 1992.

- IBRAHIM, N M; FOSTER, D N; CRABO, B G. Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. *Journal of andrology*, v. 22, n. 5, p. 891–902, 2001.
- IWAMOTO, T; HIROAKI, H; FURUICHI, Y; *et al.* Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Lett*, v. 368, p. 420–424, 1995.
- JOBIM, M. I M; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v. 61, n. 2–3, p. 255–266, 2004.
- JOBIM, M. I M; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v. 76, n. 4, p. 765–771, 2011.
- JOSEPH, AVENEL; SHUR, BARRY D; HESS, REX A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of reproduction*, v. 84, n. 2, p. 207–217, 2011.
- JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 33, n. 4, p. 536–551, 2012.
- KADIRVEL, G.; KUMAR, SATISH; KUMARESAN, A.; *et al.* Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Animal Reproduction Science*, v. 116, n. 3–4, p. 244–253, 2009.
- KOONJAENAK, S.; JOHANNISSON, A.; PONGPENG, P.; *et al.* Seasonal variation in nuclear DNA integrity of frozen-thawed spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, v. 54, n. 7, p. 377–383, 2007.
- KOONJAENAK, S.; PONGPENG, P.; WIROJWUTHIKUL, S.; *et al.* Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v. 67, n. 9, p. 1424–1435, 2007.
- KOONJAENAK, SERI; CHANATINART, VICHAI; AIUMLAMAI, SUNEERAT; *et al.* Seasonal variation in semen quality of swamp buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) in Thailand. *Asian Journal of Andrology*, v. 9, n. 1, p. 92–101, 2007.
- KOTTEK, MARKUS; GRIESER, JÜRGEN; BECK, CHRISTOPH; *et al.* World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 15, n. 3, p. 259–263, 2006.
- KUMAR, A; FAROOK, A. Effect of oxytocin on the concentration of fructose in the accessory glands of mouse. *Life Sciences*, v. 55, n. 1, p. 19–24, 1994.
- KUMAR, A; SINGH, P; BAHAKAT, M; *et al.* Effect of feed energy levels on semen quality and freezability of young murrh buffalo bulls. *Buffalo bulletin*, v. 36, n. 2, p. 415–426, 2017.
- KUMAR, P; SAINI, M; KUMAR, D; *et al.* Estimation of endogenous levels of osteopontin, total antioxidant capacity and malondialdehyde in seminal plasma: Application for fertility assessment in buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, n. 2, p. 221–226, 2017.

- KUTTY, MUHAMMED; BHURE, SANJEEV KUMAR; SHENDE, ASHISH M; *et al.* Expression of recombinant BSP3 protein and its localization studies in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, v. 87, n. 4, p. 1067–1072, 2017.
- LA FALCI, V.S.N; TORTORELLA, H; RODRIGUES, J.L; *et al.* Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, v. 57, n. 3, p. 1035–1048, 2002.
- LAPOINTE, S; AHMAD, I; BUHR, M M; *et al.* Modulation of postthaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by magnesium and manganese. *Journal of dairy science*, v. 79, n. 12, p. 2163–2169, 1996.
- LIU, Y.; QU, F.; CAO, X.; *et al.* Con A-binding protein Zn- α 2-glycoprotein on human sperm membrane is related to acrosome reaction and sperm fertility. *International Journal of Andrology*, v. 35, n. 2, p. 145–157, 2012.
- LUCONI, MICHAELA; MURATORI, MONICA; MAGGI, MARIO; *et al.* Uteroglobin and transglutaminase modulate human sperm functions. *Journal of Andrology*, v. 21, n. 5, p. 676–688, 2000.
- MALFATTI, A.; BARBATO, O.; TODINI, L.; *et al.* Blood testosterone levels in Italian Mediterranean buffalo bulls managed in two different breeding conditions. *Theriogenology*, v. 65, n. 6, p. 1137–1144, 2006.
- MANDAL, D. K.; NAGPAUL, P. K.; GUPTA, A. K. Motion characteristics of murrah buffalo bull spermatozoa in various seasons and its relationship with functional integrity of the plasmallema. *Theriogenology*, v. 60, n. 2, p. 349–358, 2003.
- MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction*, v. 9, n. 4, p. 809–815, 2012.
- MANJUNATH, P; NAUC, VERONICA; BERGERON, ANNICK; *et al.* Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen ' s Egg Yolk 1. *Biology of Reproduction*, v. 1258, p. 1250–1258, 2002.
- MANJUNATH, P; THÉRIEN, ISABELLE. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, n. 1–2, p. 109–119, 2002.
- MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *Journal of reproduction and fertility*, v. 37, n. 1, p. 179–188, 1974.
- MANN, T. Studies on the metabolism of semen; fructose as a normal constituent of seminal plasma; site of formation and function of fructose in semen. *The Biochemical journal*, v. 40, n. 4, p. 481–491, 1946.
- MARAI, I. F M; AYYAT, M. S.; ABD EL-MONEM, U. M. Growth performance and reproductive traits at first parity of New Zealand White female rabbits as affected by heat stress and its alleviation under Egyptian conditions. *Tropical Animal Health and Production*, v. 33, n. 6, p. 451–462, 2001.
- MARAI, I. F M; HAEED, A. A M. Buffalo's biological functions as affected by heat stress - A review. *Livestock Science*, v. 127, n. 2–3, p. 89–109, 2010.

MARTIN, G. B.; BLACHE, D.; MILLER, D. W.; *et al.* Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal*, v. 4, n. 7, p. 1214–1226, 2010.

MARTINS, JORGE ANDRÉ MATIAS; SOUZA, CARLOS EDUARDO AZEVEDO; SILVA, FREDY DAVID ALBUQUERQUE; *et al.* Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. *Small Ruminant Research*, v. 113, n. 1, p. 115–127, 2013.

MAYAHI, SADEGH; MAMOUEI, MORTEZA; TABATABAEI, SALEH; *et al.* Reproductive characteristics and thyroidal function in relation with season in Khuzestan buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Veterinary Research Forum*, v. 5, n. 3, p. 201–205, 2014.

MCCOOLL, C J; ENTWISTLE, K W; TOWNSEND, M P. The cycle of the seminiferous epithelium in the australian swamp buffalo. *Theriogenology*, v. 31, n. 2, p. 399–417, 1989.

MELO, M. I. V.; BARRETO FILHO, J. B.; LAGE, A. P.; *et al.* Sexual development in the male buffalo (*Bubalus bubalis*): testicular endocrinological and histological aspects. I. from birth to twelve months of age. *Buffalo bulletin*, v. 15, n. 2, p. 38–41, 1996.

MERI, SEPO; JARVA, HANNA. Complement Regulatory Proteins. *Encyclopedia of life sciences*, p. 1–7, 2001.

MOOSA-ALI, SAEED; BARATI, FARID; ESMAEILZADEH, SALEH; *et al.* The effects of seasons on the testicular parameters and epididymal sperm of the Iranian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of infertility and reproductive biology*, v. 3, n. 1, p. 150–154, 2015.

MORAIS, D. A E F; MAIA, A. S C; SILVA, R. G; *et al.* Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. 3, p. 538–545, 2008.

MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; *et al.* Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte*, v. 35, n. 2, p. 139–144, 2011.

MOURA, A. A.; MEMILI, E. Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. *Animal Reproduction*, v. 13, n. 3, p. 191–199, 2016.

MOURA, A A; KOC, HASAN; CHAPMAN, DAVID A; *et al.* Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. *Journal of Andrology*, v. 27, n. 2, p. 201–211, 2006.

MOURA, ARLINDO A; CHAPMAN, DAVID A; KOC, HASAN; *et al.* Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *Journal of andrology*, v. 27, n. 4, p. 534–541, 2006.

MRUK, DOLORES D.; SILVESTRINI, BRUNO; MO, MENG Y.; *et al.* Antioxidant superoxide dismutase - A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, v. 65, n. 4, p. 305–311, 2002.

MUHAMMAD ASLAM, M. K.; KUMARESAN, A.; SHARMA, VINAY K.; *et al.* Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology*, v. 82, n. 9, p. 1254–1262, 2014.

NANDRE, R M; FATIMA, SH; BUPHAL, G; *et al.* Assessment of variations in Indian *Bubalus*

bubalis seminal plasma proteins during winter and summer seasons. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2013.

NAUC, VERONICA; MANJUNATH, PUTTASWAMY. Radioimmunoassays for Bull Seminal Plasma Proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and Their Quantification in Seminal Plasma and Sperm. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 4, p. 1058–1066, 2000.

NIKAN, S R; DESHMUKH, B T; VADNERE, N B; *et al.* Comparative appraisal of seminal plasma lipid profile in buffalo and cow bulls. *Journal Bombay Veterinary College*, v. 13, p. 46–49, 2005.

NIXON, B; JONES, R C; HOLLAND, M K. Molecular and functional characterization of the rabbit epididymal secretory protein 52, REP52. *Biol Reprod*, v. 78, n. 5, p. 910–920, 2008.

NYNCA, JOANNA; SŁOWIŃSKA, MARIOLA; DIETRICH, MARIOLA A.; *et al.* Isolation and identification of fetuin-B-like protein from rainbow trout seminal plasma and its localization in the reproductive system. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, v. 158, n. 1, p. 106–116, 2011.

OHASHI, OTÁVIO MITIO; MIRANDA, MOYSÉS DOS SANTOS; CORDEIRO, MARCELA DA SILVA; *et al.* Desenvolvimento reprodutivo do macho bubalino: circunferência escrotal, atividade espermática e endocrinologia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n. Xvii, p. 299–306, 2007.

OKAMURA, NAOMICHI; ONOE, SHINJI; KAWAKURA, KAZUHIKO; *et al.* Effects of a membrane-bound trypsin-like proteinase and seminal proteinase inhibitors on the bicarbonate-sensitive adenylate cyclase in porcine sperm plasma membranes. *BBA - General Subjects*, v. 1035, n. 1, p. 83–89, 1990.

OLIVA, SAMARA URBAN DE; RINALDO, PÂMELA ALT; STUMPP, TAIZA. Biologia epididimária : maturação espermática e expressão gênica. *O mundo da saúde*, v. 33, n. 4, p. 419–425, 2009.

OLIVEIRA, LETÍCIA ZOCCOLARO; ARRUDA, RUBENS PAES DE; ANDRADE, ANDRÉ FURUGEN CESAR DE; *et al.* Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Animal Reproduction Science*, v. 137, n. 3–4, p. 145–155, 2013.

OLIVIER, E; SOURY, E; RUMINY, P; *et al.* Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. *The Biochemical journal*, v. 350 Pt 2, p. 589–97, 2000.

PANDEY, VIJAY; NIGAM, RAJESH; SINGH, PAWANJIT; *et al.* Influence of Season on Biochemical Attributes of Bhadawari Buffalo Bull Semen : Effect of Temperature and Humidity. p. 201–209, 2014.

PAWAR, H S; WROBEL, K H. Quantitative aspects of water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogenesis. *Archives of histology and cytology*, v. 54, n. 5, p. 491–509, 1991a.

PAWAR, H S; WROBEL, K H. The sertoli cell of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) during the spermatogenic cycle. *Cell and Tissue Research*, v. 265#3222, p. 43–50, 1991b.

PELOILLE, SYLVIE; I, ANNICK ESNARD; DACHEUX, JEAN-LOUIS; *et al.* Interactions between ovine cathepsin L , cystatin C and or , -macroglobulin Potential role in the genital tract. v. 146, p. 140–146, 1997.

- PERERA, B M A O. Reproductive cycles of buffalo. *Animal Reproduction Science*, v. 124, p. 194–199, 2011.
- PERO, M E; KILLIAN, GARY J; LOMBARDI, P; *et al.* Identification of osteopontin in water buffalo semen. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, n. 1, p. 279, 2007.
- PERUMAL, PONRAJ; SRIVASTAVA, SURESH KUMAR; VUPRU, KEZHAVITUO; *et al.* Biochemical profiles in freezable and non-freezable ejaculates of Mithun (*Bos frontalis*) semen. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v. 3, n. 1, p. 19–26, 2015.
- PEZZOPANE, CRISTIANA DE GASPARI; SANTOS, PATRÍCIA MENEZES; CRUZ, PEDRO GOMES DA; *et al.* Estresse por deficiência hídrica em genótipos de *Brachiaria brizantha*. *Ciência Rural*, v. 45, n. 5, p. 871–876, 2015.
- PLANTE, GENEVIÈVE; PRUD, BRUNO; FAN, JINJIANG; *et al.* Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. p. 105–127, 2016.
- POIANI, ALDO. Complexity of seminal fluid: A review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 60, n. 3, p. 289–310, 2006.
- RAMADAN, TAMER AWAD. Role of melatonin in reproductive seasonality in buffaloes. *Theriogenology*. [S.l.]: Intech - Open science/ open minds, 2017. p. 87–107.
- RANA, BABBAR K.; BILASPURI, G.S. A quantitative study of seminiferous tubular cells in the developing Murrah buffalo testis. *Veterinary Journal*, v. 167, n. 1, p. 95–103, 2004.
- RASUL, Z.; ANZAR, M.; JALALI, S.; *et al.* Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 59, n. 1–2, p. 31–41, 2000.
- REGO, J. P. A.; MARTINS, J. M.; WOLF, C. A.; *et al.* Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in Guzerat bulls. *Journal of Animal Science*, v. 94, n. 12, p. 5308–5320, 2016.
- REGO, J P A; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; *et al.* Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Animal Reproduction Science*, v. 148, n. 1–2, p. 1–17, 2014.
- REINERT, M; CALVETE, J J; SANZ, L; *et al.* Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 242, p. 636–640, 1996.
- RICKARD, J P; LEAHY, T; SOLEILHAVOUP, C; *et al.* The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. *Journal of Proteomics*, v. 126, p. 303–311, 2015.
- RIFFO, M; LEIVA, S; ASTUDILLO, J. Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *International Journal of Andrology*, v. 15, n. 3, p. 229–237, 1992.
- ROBAIRE, B.; ORGEBIN-CRIST, M. C. The epididymis. In: KNOBIL; NEILL (Org.). . *Physiology of reproduction*. 3. ed. [S.l.]: Elsevier, 2006. p. 1072–1120.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, HERIBERTO; KVIST, ULRIK; ERNERUDH, JAN; *et al.* Seminal Plasma Proteins : What Role Do They Play ? *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 66, n. 1, p. 11–22, 2011.

- RUSSELL, MICHAEL W; MESTECKY, JIRI. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 4, n. 6, p. 667–77, 2002.
- SANSONE, G.; NASTRI, M. J.F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1–3, p. 55–76, 2000.
- SARIÖZKAN, SERPIL; TUNCER, P. B.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; *et al.* Antioxidative effects of cysteamine, hyaluronan and fetuin on post-thaw semen quality, DNA integrity and oxidative stress parameters in the Brown Swiss bull. *Andrologia*, v. 47, n. 2, p. 138–147, 2015.
- SCOTT, T W; DAWSON, R M. Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. *The Biochemical journal*, v. 108, n. 3, p. 457–463, 1968.
- SELVARAJU, S.; SIVASUBRAMANI, T.; RAGHAVENDRA, B. S.; *et al.* Effect of dietary energy on seminal plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I), serum IGF-I and testosterone levels, semen quality and fertility in adult rams. *Theriogenology*, v. 78, n. 3, p. 646–655, 2012.
- SELVARAJU, SELLAPPAN; SOMASHEKAR, LAKSHMINARAYANA; KRISHNAN, BINSILA B.; *et al.* Relationship between seminal plasma tuberoinfundibular peptide of 39 residues and sperm functional attributes in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 10, p. 1622–1630, 2016.
- SHARMA, A. K.; GUPTA, R. C. Duration of seminiferous epithelial cycle in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science*, v. 3, p. 217–224, 1980.
- SHARMA; PANDEY, V.; NIGAM, R.; *et al.* Association of oxidative status and semen characteristics with seminal plasma proteins of buffalo semen. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 17, n. 4, p. 226–230, 2016.
- SHARMA; PANDEY, V; NIGAM, R; *et al.* Seasonal Variations in Seminal Plasma Proteins of Buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, n. 3, p. 387–391, 2014.
- SHARMA; PANDEY, VIJAY; NIGAM, RAJESH; *et al.* Association of Semen Attributes and Seminal Plasma Proteins of Buffalo Bulls. *Journal of Animal Research*, v. 5, n. 1, p. 119–123, 2015.
- SHENDE, A.; BHURE, S.K.; PILLAI, H.; *et al.* Altered Expression Pattern of Major Seminal Plasma Protein Genes in Seminal Vesicles of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, v. 87, n. 3, 2015.
- SHUKLA, M. K.; MISRA, A. K.; GUPTA, H. P. Studies on some biochemical constituents of Murrah buffalo (*Bubalus Bubalis*) seminal plasma. *Buffalo Bulletin*, v. 28, n. 3, p. 123–126, 2009.
- SILVA, L. K. X.; SOUSA, J. S.; SILVA, A. O. A.; *et al.* Testicular thermoregulation, scrotal surface temperature patterns and semen quality of water buffalo bulls reared in a tropical climate. *Andrologia*, v. 00:e12836, p. 1–10, 2017.
- SINGH, B; MAHAPATRO, B B; SADHU, D P. Chemical composition of cattle and buffalo spermatozoa and seminal plasma under different climatic conditions. *Journal of reproduction and fertility*, v. 20, n. 1, p. 175–178, 1969.
- SINGH, P; SENGUPTA, B P; TRIPATHI, V N. Effect of multiple showering and vitamin supplementation on sexual behaviour, quality and freezability of buffalo bull semen. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, v. 14, n. 2, p. 184–188, 2001.

SINGH; GHOSH, S. K.; PRASAD, J. K.; *et al.* Seminal PDC-109 protein vis-à-vis cholesterol content and freezability of buffalo Spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 144, n. 1–2, p. 22–29, 2014.

SKANDHAN, K P; MAZUMDAR, B N. Correlation of sodium and potassium in human seminal plasma with fertilizing capacity of normal, and infertile subjects. *Andrologia*, v. 13, n. 2, p. 147–154, 1981.

SKIBIEL, AMY L.; ZACHUT, MAYA; DO AMARAL, BRUNO C.; *et al.* Liver proteomic analysis of postpartum Holstein cows exposed to heat stress or cooling conditions during the dry period. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 1, p. 705–716, 2018.

SMITH, JEREMY T.; CLAY, COLIN M.; CARATY, ALAIN; *et al.* KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, v. 148, n. 3, p. 1150–1157, 2007.

SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; *et al.* Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *Journal of Proteomics*, v. 109, p. 245–260, 2014.

SOUZA, C. E A; MOURA, ARLINDO A.; MONACO, ELISA; *et al.* Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science*, v. 105, n. 1–2, p. 72–89, 2008.

SOUZA, CARLOS EDUARDO A; REGO, JOÃO PAULO A; LOBO, CARLOS H.; *et al.* Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 14, p. 4436–4456, 2012.

SWEGEN, A.; CURRY, B. J.; GIBB, Z.; *et al.* Investigation of the stallion sperm proteome by mass spectrometry. *Reproduction*, v. 149, n. 3, p. 235–244, 2015.

TEDESCHI, GABRIELLA; OUNGRE, EMANUELA; MORTARINO, MICHELE; *et al.* Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 20, p. 6175–6179, 2000.

TOGO, TATSURU; MORISAWA, MASAOKI. GPI-Anchored Aminopeptidase Is Involved in the Acrosome Reaction in Sperm of the Mussel *Mytilus edulis*. *Molecular Reproduction and Development*, v. 67, n. 4, p. 465–471, 2004.

VALE, W. G. Effects of environment on buffalo reproduction. *Italian Journal of Animal Science*, v. 6, n. SUPPL. 2, p. 130–142, 2007.

VALE, WILLIAM GOMES; RIBEIRO, HAROLDO F L; SOUSA, JOSE S; *et al.* Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 2, p. 141–155, 2008.

VAN TILBURG, MAURICIO FRAGA; RODRIGUES, M. A.M.; MOREIRA, R. A.; *et al.* Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. *Theriogenology*, v. 79, n. 9, p. 1247–1261, 2013.

VAN TILBURG, MAURICIO FRAGA; SOUSA, SOLANGE DAMASCENO; FERREIRA DE MELO, RÉVILA BIANCA; *et al.* Proteome of the rete testis fluid from tropically-adapted Morada Nova rams. *Animal Reproduction Science*, v. 176, p. 20–31, 2017.

- VERSTERGEN, J; IGUER-OUADA, M; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149–179, 2002.
- VILAGRAN, INGRID; CASTILLO, JUDIT; BONET, SERGI; *et al.* Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*, v. 80, n. 5, p. 443–450, 2013.
- WONG, WAI YEE; FLIK, GERT; GROENEN, P. M W; *et al.* The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproductive Toxicology*, v. 15, n. 2, p. 131–136, 2001.
- YOUNIS, MUHAMMAD; SAMAD, H A; AHMAD, N; *et al.* Fertility of frozen-thawed semen collected from young, adult and old buffalo bulls during low and peak breeding seasons. *Pakistan Veterinary Journal*, v. 19, n. 2, p. 78–80, 1999.
- ZHANG, P.-F.; HUANG, Y.-L.; FU, Q.; *et al.* Comparative proteomic analysis of different developmental stages of swamp buffalo testicular seminiferous tubules. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, n. 6, p. 1–9, 2017.
- ZHOU, JI; CHEN, LI; LI, JIE; *et al.* The semen pH affects sperm motility and capacitation. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2015.

Supporting information 2: Buffalo seminal plasma proteins identify by two-dimensional electrophoresis and tandem mass spectrometry (ESI-Q-ToF). Spot numbers refer to those shown in the 2D gel – Supporting information 1

Protein and spot number	Exp. ¹ kDa/pI	NCBI accession number	MS/M S protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z	z
Secretoglobin, family 2A, member 2 Spot 4	10.96/4.06	329009633	253	48	¹³ AVDPTVSK ²⁰	32	4.087.197	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	87	4.605.557	3
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	80	4.605.564	3
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	53	6.903.354	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	104	6.903.426	2
					²⁵ EYLKDFAR ³²	35	5.212.553	2
					³³ TDDEKNAVDELK ⁴⁴	66	6.888.251	2
Spot 5	10.82/4.13	329009633	236	48	³⁸ NAVDELK ⁴⁴	16	3.947.034	2
					¹³ AVDPTVSK ²⁰	28	4.087.157	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	88	4.605.429	3
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	80	6.903.132	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	58	6.903.265	2
					²⁵ EYLKDFAR ³²	35	5.212.518	2
					³³ TDDEKNAVDELK ⁴⁴	28	4.595.405	3
Spot 6	10.92/4.23	329009633	216	48	³³ TDDEKNAVDELK ⁴⁴	68	6.888.190	2
					³⁸ NAVDELK ⁴⁴	17	3.947.006	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	80	6.903.305	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	101	4.605.566	3
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	59	6.903.367	2
					²⁵ EYLKDFAR ³²	35	5.212.416	2
					³³ TDDEKNAVDELK ⁴⁴	66	6.888.281	2
Spot 12	15.30/4.24	329009633	88	30	³⁸ NAVDELK ⁴⁴	14	3.947.009	2
					¹³ AVDPTVSK ²⁰	13	4.087.242	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	65	6.903.431	2
Spot 16	18.49/4.26	329009633	74	18	²⁵ EYLKDFAR ³²	10	5.212.653	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	74	4.605.569	3

Spot 115	9.59/4.61	329009633	185	48	¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	101	4.605.573	3
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	62	6.903.406	2
					¹³ AVDPTVSKDEYR ²⁴	90	6.903.430	2
					²⁵ EYLKDFAR ³²	28	5.212.710	2
					³³ TDDEKNAVDELK ⁴⁴	48	6.888.278	2
					³⁸ NAVDELK ⁴⁴	8	3.947.070	2
PREDICTED: secretoglobin family 1D member-like	9.7	594037224	187	39	³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	21	6.818.392	2
Spot 1					³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	49	6.818.392	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	30	5.798.071	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	49	5.798.132	2
					⁷⁵ LIITNILK ⁸²	16	4.643.134	2
					⁸⁴ ILLNCTVTDVK ⁹⁴	73	6.383.474	2
					⁸⁴ ILLNCTVTDVK ⁹⁴	69	6.383.521	2
Spot 105	28.37/10.2 2	594037224	137	31	³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	41	6.818.370	2
					³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	47	6.818.386	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	37	5.798.071	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	42	5.798.107	2
					⁸⁴ ILLNCTVTDVK ⁹⁴	48	6.383.500	2
Spot 107	16.42	594037224	197	39	³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	41	6.818.385	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	44	5.797.985	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	47	5.798.089	2
					⁷⁵ LIITNILK ⁸²	20	4.643.153	2
					⁸⁴ ILLNCTVTDVK ⁹⁴	52	6.383.497	2
					⁸⁴ ILLNCTVTDVK ⁹⁴	88	6.383.510	2
Spot 108	11.31	594037224	242	40	³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	69	6.818.257	2
					³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	60	6.818.385	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	45	5.798.027	2
					⁷⁵ LIITNILK ⁸²	32	4.643.097	2
					⁷⁵ LIITNILK ⁸²	21	4.643.118	2
					⁷⁵ LIITNILKK ⁸³	13	3.525.734	3
					⁷⁵ LIITNILKK ⁸³	23	5.283.619	2

Spot 109	11.33/10.2 0	594037224	143	40	84ILLNCTVTDVK ⁹⁴	72	6.383.519	2
					34FFYLPDELYR ⁴³	45	6.818.383	2
					49YNAPPEVVAAK ⁵⁹	43	5.798.059	2
					49YNAPPEVVAAK ⁵⁹	46	5.798.116	2
					75LIITNILK ⁸²	23	4.643.104	2
					75LIITNILKK ⁸³	13	3.525.730	3
					75LIITNILKK ⁸³	10	5.283.611	2
Spot 110	9.90/10.34	594037224	281	40	84ILLNCTVTDVK ⁹⁴	17	6.383.494	2
					34FFYLPDELYR ⁴³	44	6.817.937	2
					49YNAPPEVVAAK ⁵⁹	50	5.798.070	2
					75LIITNILK ⁸²	27	4.643.122	2
					75LIITNILKK ⁸³	16	5.283.616	2
					83KILLNCTVTDVK ⁹⁴	68	7.023.970	2
					84ILLNCTVTDVK ⁹⁴	52	6.383.228	2
Spot 111	9.90/10.16	594037224	312	40	84ILLNCTVTDVK ⁹⁴	75	6.383.262	2
					84ILLNCTVTDVK ⁹⁴	71	6.383.495	2
					34FFYLPDELYR ⁴³	69	6.818.361	2
					49YNAPPEVVAAK ⁵⁹	45	5.798.063	2
					49YNAPPEVVAAK ⁵⁹	35	5.798.092	2
					75LIITNILK ⁸²	25	4.643.011	2
					75LIITNILKK ⁸³	36	3.525.730	3
Spot 120	10.90/8.30	594037224	64	20	75LIITNILKK ⁸³	31	5.283.624	2
					83KILLNCTVTDVK ⁹⁴	62	7.023.976	2
					84ILLNCTVTDVK ⁹⁴	74	6.383.323	2
					84ILLNCTVTDVK ⁹⁴	49	6.383.323	2
					34FFYLPDELYR ⁴³	37	6.818.368	2
					49YNAPPEVVAAK ⁵⁹	27	5.798.066	2
					Spot 121	11.35/7.60	594037224	91
34FFYLPDELYR ⁴³	41	6.818.381	2					
34FFYLPDELYR ⁴³	45	6.818.394	2					
Spot 122	12.30/8.84	594037224	88	28	49YNAPPEVVAAK ⁵⁹	46	5.798.094	2
					34FFYLPDELYR ⁴³	35	6.818.406	2

					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	36	5.798.095	2
					⁷⁵ LIITNILK ⁸²	17	4.643.102	2
Spot 123	12.09/8.05	594037224	114	28	³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	49	6.818.368	2
					³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	41	6.818.378	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	49	5.798.079	2
					⁷⁵ LIITNILK ⁸²	16	4.643.152	2
Spot 168	9.84/9.46	594037224	343	40	³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	69	6.818.024	2
					³⁴ FFYLPDELYR ⁴³	53	6.818.395	2
					⁴⁹ YNAPPEVVAAK ⁵⁹	49	5.798.096	2
					⁷⁵ LIITNILK ⁸²	32	4.643.111	2
					⁷⁵ LIITNILK ⁸²	30	4.643.120	2
					⁷⁵ LIITNILKK ⁸³	33	5.283.633	2
					⁸³ KILLNCTVTDVK ⁹⁴	84	7.024.026	2
					⁸⁴ ILLNCTVTDVK ⁹⁴	75	6.383.111	2
					⁸⁴ ILLNCTVTDVK ⁹⁴	68	6.383.274	2
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: cystatin-9	14.6/3.22	741888261	39	9	¹ MGR ³		3.631.477	1
Spot 3					⁴ QGR ⁶		3.601.276	1
					⁴ DGRCR ⁸		6.632.352	1
					⁴³ FLK ⁴⁵		4.071.801	1
					⁶⁷ NAYK ⁷⁰		4.952.450	1
Acrosin inhibitor 1, partial	14.14/4.12	440900265	109	49	¹⁶ VYTEACTR ²³	46	5.002.241	2
Spot 10					¹⁶ VYTEACTR ²³	31	5.002.271	2
					²⁴ EYNPICASDAK ³⁴	43	6.342.814	2
					³⁵ TYSNECTFCNEK ⁴⁶	20	7.768.092	2
Spot 11	13.98/4.25	440900265	141	49	¹⁶ VYTEACTR ²³	48	5.002.309	2
					²⁴ EYNPICASDAK ³⁴	49	6.342.831	2
					³⁵ TYSNECTFCNEK ⁴⁶	45	7.768.082	2
					³⁵ TYSNECTFCNEK ⁴⁶	0	7.768.091	2
Acrosin	28.37/10.2	1888363	132	6	⁹⁵ YSASSEANDIALIK ¹⁰⁸	15	7.413.748	2
Spot 105	2				⁹⁵ YSASSEANDIALIK ¹⁰⁸	86	7.413.748	2
					¹⁸² STNVCAGYPEGK ¹⁹³	46	6.417.889	2

					¹⁸² STNVCAGYPEGK ¹⁹³	44	6.417.896	2
PREDICTED: acrosin-binding protein isoform X1	10.77/6.11	297475301	144	4	³⁶⁷ HLAACTLCDFCSLK ³⁸⁰	37	5.659.211	3
Spot 114					³⁶⁷ HLAACTLCDFCSLK ³⁸⁰	31	5.659.212	3
					³⁶⁷ HLAACTLCDFCSLK ³⁸⁰	51	8.483.881	2
					³⁸¹ LEQCHSEANLQR ³⁹²	45	4.955.605	3
					³⁸¹ LEQCHSEANLQR ³⁹²	18	4.955.621	3
					³⁸¹ LEQCHSEANLQR ³⁹²	93	7.428.465	2
					³⁸¹ LEQCHSEANLQR ³⁹²	65	7.428.472	2
PREDICTED: allergen Bos d 2- like isoform X1	15.89/4.22	594103693	108	17	³⁴ TIYAAADNK ⁴²	15	4.837.448	2
Spot 13					³⁴ TIYAAADNKEK ⁴⁴	30	6.123.146	2
					¹³⁶ GTSFTPEEFQK ¹⁴⁶	22	6.357.985	2
					¹⁴⁷ YQQLNTER ¹⁵⁴	41	5.262.586	2
PREDICTED: WAP four-disulfide core domain protein 2	18.85/3.91	594037564	210	56	⁴⁷ ACVLDEDCDDNLK ⁵⁹	96	7.838.206	2
Spot 14					⁴⁷ ACVLDEDCDDNLK ⁵⁹	111	7.838.211	2
					⁶⁰ CCEAGCATVCQMPNDKPGSCPNVDIAFPQLGLCR ⁹ ₃	18	12.948.81	3
					⁶⁰ CCEAGCATVCQMPNDKPGSCPNVDIAFPQLGLCR ⁹ ₃	19	12.948.84	3
					⁹⁴ DQCQVDSQCPDALK ¹⁰⁷	54	8.323.445	2
					¹⁰⁸ CCINGCGR ¹¹⁵	26	4.986.893	2
Spot 15	18.40/4.06	555998471	235	56	⁴⁷ ACVLDEDCDDNLK ⁵⁹	104	7.837.987	2
					⁴⁷ ACVLDEDCDDNLK ⁵⁹	110	7.838.182	2
					⁶⁰ CCQAGCATVCQMPNDKPGSCPNVDIAFPQLGLCR ⁹ ₃	22	12.945.38	3
					⁹⁴ DQCQVDSQCPDALK ¹⁰⁷	83	8.323.550	2
					¹⁰⁸ CCINGCGR ¹¹⁵	21	4.986.902	2
Spot 16	18.49/4.26	555998471	222	34	⁴⁷ ACVLDEDCDDNLK ⁵⁹	104	7.838.185	2
					⁴⁷ ACVLDEDCDDNLK ⁵⁹	96	7.838.197	2
					⁹⁴ DQCQVDSQCPDALK ¹⁰⁷	41	8.323.441	2
					⁹⁴ DQCQVDSQCPDALK ¹⁰⁷	83	8.323.503	2
					¹⁰⁸ CCINGCGR ¹¹⁵	11	4.986.958	2
					¹¹⁶ VSCVTPVF ¹²³	24	9.084.603	1
PREDICTED: double-headed protease inhibitor	19.10/4.59	594092233	269	52	⁵¹ IWSPICGIDK ⁶⁰	56	5.947.999	2

Spot 17					⁶² TYSNECMFCFLNSDK ⁷⁶	23	9.583.873	2
					⁶² TYSNECMFCFLNSDK ⁷⁶	49	9.583.881	2
					⁶² TYSNECMFCFLNSDK ⁷⁶	66	9.663.821	2
					⁸² KLHDNECR ⁸⁹	43	5.362.376	2
					⁸² KLHDNECR ⁸⁹	36	5.362.468	2
					⁹⁰ EVECTTYSEICTMEYIPHCGSDGIVYGNR ¹¹⁸	56	11.474.88 3	3
					⁹⁰ EVECTTYSEICTMEYIPHCGSDGIVYGNR ¹¹⁸	27	11.528.18 8	3
					¹¹⁹ CAFCNAVVK ¹²⁷	17	5.347.490	2
Spot 18	19.01/4.82	594092233	78	20	⁶² TYSNECMFCFLNSDK ⁷⁶	36	9.583.842	2
					⁶² TYSNECMFCFLNSDK ⁷⁶	16	9.583.878	2
					⁸² KLHDNECR ⁸⁹	15	5.362.434	2
					⁸² KLHDNECR ⁸⁹	31	5.362.470	2
					¹³⁰ GTLYFVK ¹³⁶	11	4.142.321	2
Seminal plasma protein A3, partial	18.49/4.26	393885953	49	14	³⁷ EMEDIASGAETK ⁴⁸		6.487.824	2
Spot 16					¹⁰⁷ SYQACIK ¹¹³		4.352.073	2
Spot 127	13.76/7.98	393885953	190	31	³⁷ EMEDIASGAETK ⁴⁸	54	6.407.866	2
					³⁷ EMEDIASGAETK ⁴⁸	72	6.487.831	2
					⁹⁷ CVFPIYGNK ¹⁰⁶	23	6.228.065	2
					⁹⁷ CVFPIYGNK ¹⁰⁶	47	6.228.077	2
					⁹⁷ CVFPIYGNK ¹⁰⁶	33	6.228.085	2
					¹⁰⁷ SYQACIK ¹¹³	9	4.352.071	2
					¹²¹ YWCSLSPNFEDR ¹³³	62	8.448.554	2
PREDICTED: seminal plasma protein BSP30 kDa-like	21.23/4.41	594056516	156	18	¹³⁸ DEPECVFPFIYR ¹⁴⁹	42	7.863.630	2
Spot 20					¹³⁸ DEPECVFPFIYR ¹⁴⁹	17	7.863.652	2
					¹⁵¹ KYYESCTR ¹⁵⁸	25	5.537.512	2
					¹⁵² YYESCTR ¹⁵⁸	35	4.897.000	2
					¹⁶⁶ SWCSLTSNYDR ¹⁷⁶	48	6.947.975	2
					¹⁶⁶ SWCSLTSNYDRDK ¹⁷⁸	7	5.445.710	3
Spot 157	21.23/4.41	594056516	397	28	¹⁰⁷ KYYMCTR ¹¹³	37	5.112.296	2
					¹⁰⁷ KYYMCTR ¹¹³	29	5.192.258	2
					¹³³ FCTEKDEPECVFPFIYR ¹⁴⁹	48	7.463.355	3

					¹³³ FCTEKDEPECVFPIYR ¹⁴⁹	45	11.190.154	2
					¹³⁸ DEPECVFPIYR ¹⁴⁹	42	7.863.625	2
					¹⁵¹ KYYESCTR ¹⁵⁸	48	5.537.507	2
					¹⁵² YYESCTR ¹⁵⁸	44	4.896.912	2
					¹⁵² YYESCTR ¹⁵⁸	43	4.896.960	2
					¹⁵⁹ VYSFFWR ¹⁶⁵	35	5.027.434	2
					¹⁶⁶ SWCSLTSNYDR ¹⁷⁶	61	6.947.916	2
					¹⁶⁶ SWCSLTSNYDR ¹⁷⁶	64	6.947.954	2
					¹⁶⁶ SWCSLTSNYDRDK ¹⁷⁸	56	5.445.682	3
					¹⁶⁶ SWCSLTSNYDRDK ¹⁷⁸	80	8.163.586	2
14-3-3 protein zeta chain	26.06/4.51	253706	284	25	²⁸ SVTEQGAELSNEER ⁴¹	92	7.748.558	2
Spot 22					⁴² NLLSVAYK ⁴⁹	26	4.542.601	2
					⁶¹ VVSSIEQK ⁶⁸	20	4.452.459	2
					¹⁰⁴ FLIPNASQAESK ¹¹⁵	42	6.528.432	2
					¹²⁸ YLAEVAAGDDKK ¹³⁹	32	4.272.098	3
					¹²⁸ YLAEVAAGDDKK ¹³⁹	65	6.403.258	2
					¹⁵⁹ EMQPTHPIR ¹⁶⁷	40	3.755.155	3
Clusterin preproprotein	31.34/4.45	27806907	313	15	⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	68	6.242.952	2
Spot 23					⁵² TQIEQTNEERK ⁶²	24	4.592.363	3
					⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	13	6.158.717	2
					⁶³ LLSSLEEAK ⁷²	17	5.518.170	2
					⁶³ LLSSLEEAKK ⁷³	10	4.109.094	3
					¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	90	7.143.253	2
					¹⁹³ RPQDTQYYSFSSFP ²⁰⁸	44	6.593.068	3
					²⁰⁹ GSLFFNPK ²¹⁶	23	4.552.395	2
					³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	26	7.638.945	2
Spot 24	32.49/4.16	27806907	351	15	³⁵ YVNKEIK ⁴¹	6	4.472.550	2
					⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	68	6.242.910	2
					⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	57	6.158.604	2
					⁶³ LLSSLEEAK ⁷²	61	5.518.164	2
					¹⁶² EQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	44	6.149.230	3

Spot 158	25.23/4.47	27806907	306	9	¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁷⁶	73	7.063.294	2
					¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	90	7.143.244	2
					³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	26	7.638.961	2
					⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	63	6.242.932	2
					⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	49	6.242.940	2
					⁶³ LLSSLEEAK ⁷²	53	5.518.205	2
					⁶³ LLSSLEEAKK ⁷³	42	4.109.076	3
					¹⁵³ IDSLMENDR ¹⁶¹	53	5.547.491	2
					¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	94	7.063.287	2
Spot 159	27.67/4.61	27806907	396	13	¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	75	7.143.251	2
					⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	58	6.242.929	2
					⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	69	6.242.944	2
					⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	32	4.109.085	3
					⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	56	6.158.665	2
					⁶³ LLSSLEEAK ⁷²	71	5.518.178	2
					¹⁵³ IDSLMENDR ¹⁶¹	73	5.467.515	2
					¹⁵³ IDSLMENDR ¹⁶¹	70	5.547.468	2
					¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	84	7.143.244	2
					¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	70	7.143.247	2
					¹⁹³ RPQDTQYYSPFSSFPR ²⁰⁸	44	6.593.090	3
PREDICTED: clusterin isoform X1 Spot 25	32.30/4.78	594072990	407	19	⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	69	6.242.929	2
					⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	55	6.158.680	2
					⁶³ LLSSLEEAK ⁷²	29	5.518.173	2
					¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	80	7.063.273	2
					¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	95	7.063.335	2
					¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	90	7.143.236	2
					¹⁹³ RPQDTQYYSPFSSFPR ²⁰⁸	44	6.593.059	3
					²⁰⁹ GSLFFNPK ²¹⁶	25	4.552.410	2
					²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	53	6.769.509	3
					²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	58	6.822.821	3
					²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	44	6.876.189	3
³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	33	7.638.933	2					

Spot 26	33.20/4.44	594072990	475	31	332LYDQLLQSYQQK ³⁴³	18	7.638.942	2
					52TQIEQTNEER ⁶¹	59	6.242.854	2
					153IDSLMENDR ¹⁶¹	87	5.467.474	2
					153IDSLMENDR ¹⁶¹	70	5.547.477	2
					153IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	29	7.258.076	4
					177ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	88	7.063.213	2
					177ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	88	7.063.258	2
					193RPQDTQYYS PFSSFPR ²⁰⁸	58	6.593.027	3
					193RPQDTQYYS PFSSFPR ²⁰⁸	59	9.884.617	2
					259TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	63	6.769.503	3
					297CQEILEVDCSASNPSQMLLR ³¹⁶	28	11.835.41	2
						3		
					Spot 27	34.70/4.32	594072990	517
401LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	38	10.254.96	3					
	1							
63LLLSSLEEAK ⁷²	56	5.518.022	2					
153IDSLMENDR ¹⁶¹	87	5.467.491	2					
153IDSLMENDR ¹⁶¹	62	5.547.465	2					
153IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	40	7.218.168	4					
177ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	90	7.063.011	2					
177ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	88	7.063.155	2					
177ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	89	7.143.000	2					
193RPQDTQYYS PFSSFPR ²⁰⁸	58	6.593.001	3					
193RPQDTQYYS PFSSFPR ²⁰⁸	62	9.884.580	2					
209GSLFFNPK ²¹⁶	36	4.552.318	2					
259TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	58	6.769.531	3					
259TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	45	10.149.34	2					
	6							
259TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	66	6.822.825	3					
332LYDQLLQSYQQK ³⁴³	53	7.638.807	2					
401LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	27	10.201.58	3					
	4							
401LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	15	10.255.03	3					
	8							

Spot 28

35.39/4.20 594072990 804 33

²⁴ ELQEMSTEGSK ³⁴	48	6.277.737	2
⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	46	6.242.868	2
⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	60	6.242.893	2
⁵² TQIEQTNEERK ⁶²	24	4.592.202	3
⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	66	6.158.648	2
⁶³ LSSSLEEAK ⁷²	56	5.518.091	2
⁶³ LSSSLEEAKK ⁷³	43	4.109.062	3
¹⁵³ IDSLMENDR ¹⁶¹	71	5.467.488	2
¹⁵³ IDSLMENDR ¹⁶¹	74	5.547.456	2
¹⁵³ IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	75	7.218.116	4
¹⁵³ IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	38	9.620.842	3
¹⁵³ IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	42	7.258.103	4
¹⁶² EQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	43	6.095.907	3
¹⁶² EQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	38	6.149.230	3
¹⁷⁷ ASSIMDELQDR ¹⁸⁸	79	7.063.218	2
¹⁷⁷ ASSIMDELQDR ¹⁸⁸	52	7.063.218	2
¹⁷⁷ ASSIMDELQDR ¹⁸⁸	89	7.143.177	2
¹⁹³ RPQDTQYSPFSSFPR ²⁰⁸	56	6.593.087	3
¹⁹³ RPQDTQYSPFSSFPR ²⁰⁸	58	9.884.681	2
²⁰⁹ GSLFFNPK ²¹⁶	45	4.552.403	2
²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	56	6.769.516	3
²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	29	10.149.36	2
		4	
²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	48	6.822.826	3
²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	56	6.876.165	3
³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	11	7.638.925	2
³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	39	7.638.951	2
⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	30	10.201.59	3
		7	
⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	10	10.254.95	3
		0	
⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	18	10.254.97	3
		6	

Spot 29

36.43/4.14 594072990 715 30

⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	46	6.242.852	2
--	----	-----------	---

⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	60	6.242.871	2
⁵² TQIEQTNEERK ⁶²	44	4.592.203	3
⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	29	4.109.032	3
⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	63	6.158.642	2
⁶³ LLSSLEEAK ⁷²	54	5.518.051	2
¹⁵³ IDSLMENDR ¹⁶¹	87	5.467.476	2
¹⁵³ IDSLMENDR ¹⁶¹	61	5.547.471	2
¹⁵³ IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	53	7.218.093	4
¹⁵³ IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	34	7.258.110	4
¹⁵³ IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ¹⁷⁶	35	7.298.105	4
¹⁷⁷ ASSIMDELQDR ¹⁸⁸	88	7.063.132	2
¹⁷⁷ ASSIMDELQDR ¹⁸⁸	103	7.063.197	2
¹⁷⁷ ASSIMDELQDR ¹⁸⁸	90	7.143.214	2
¹⁹³ RPQDTQYSPFSSFPR ²⁰⁸	59	6.592.966	3
¹⁹³ RPQDTQYSPFSSFPR ²⁰⁸	75	9.884.598	2
²⁰⁹ GSLFFNPK ²¹⁶	45	4.552.264	2
²⁵⁹ TPYHFPMMFTENNDR ²⁷⁴	55	6.769.496	3
²⁵⁹ TPYHFPMMFTENNDR ²⁷⁴	37	10.149.35	2
²⁵⁹ TPYHFPMMFTENNDR ²⁷⁴	69	6.822.787	3
²⁵⁹ TPYHFPMMFTENNDR ²⁷⁴	57	6.876.148	3
²⁵⁹ TPYHFPMMFTENNDR ²⁷⁴	37	6.876.214	3
³³² LYDQLLSYQQK ³⁴³	32	7.638.726	2
³³² LYDQLLSYQQK ³⁴³	21	7.638.926	2
⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	32	10.201.66	3
		4	
⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	64	6.242.908	2
⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	35	4.109.053	3
⁶² KLLSSLEEAK ⁷²	86	6.158.672	2
⁶³ LLSSLEEAK ⁷²	61	5.518.150	2
¹⁷⁷ ASSIMDELQDR ¹⁸⁸	70	7.063.246	2
¹⁷⁷ ASSIMDELQDR ¹⁸⁸	90	7.143.261	2
¹⁹³ RPQDTQYSPFSSFPR ²⁰⁸	51	6.593.063	3

Spot 30

37.25/4.10 594072990 544 30

						²⁰⁹ GSLFFNPK ²¹⁶	37	4.552.396	2
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	55	6.769.519	3
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	76	6.822.799	3
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	59	6.876.153	3
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	15	6.876.165	3
						²⁹⁷ CQEILEVDCSASNPSQMLLR ³¹⁶	13	11.835.320	2
						³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	33	7.638.851	2
						³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	19	7.638.928	2
						⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	32	10.201.632	3
						⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	28	10.254.946	3
						⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	35	10.254.965	3
Spot 31	38.74/4.04	594072990	348	23		⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	68	6.242.938	2
						¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	18	7.063.274	2
						¹⁷⁷ ASSIMDELFQDR ¹⁸⁸	82	7.143.235	2
						¹⁹³ RPQDTQYYSPFSSFPR ²⁰⁸	52	6.593.050	3
						²⁰⁹ GSLFFNPK ²¹⁶	20	4.552.380	2
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	41	6.769.477	3
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	43	6.769.493	3
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	61	6.822.796	3
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	43	6.822.803	3
						²⁵⁹ TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	57	6.876.117	3
						³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	15	7.638.891	2
						³³² LYDQLLQSYQQK ³⁴³	32	7.638.897	2
						⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	10	10.201.616	3
						⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	17	10.254.915	3
						⁴⁰¹ LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	33	10.254.941	3
Spot 46	67.23/4.20	594072990	634	30		⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	50	6.242.910	2
						⁵² TQIEQTNEER ⁶¹	64	6.242.941	2

					259TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	52	6.769.505	3
					259TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	60	6.822.812	3
					259TPYHFPMMEFTENNDR ²⁷⁴	64	6.876.133	3
					332LYDQLLQSYQQK ³⁴³	30	7.638.915	2
					332LYDQLLQSYQQK ³⁴³	12	7.638.959	2
					401LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	18	10.254.89 3	3
					401LFNSFPFTVTVPQEVSSPNFMENVAEK ⁴²⁷	32	10.254.93 7	3
PREDICTED: phosphoglycolate phosphatase	31.04/4.79	594108113	273	22	96GETAVPGAPETLTALR ¹¹¹	29	7.919.224	2
Spot 25					117LAFITNNSK ¹²⁶	27	5.477.919	2
					167LAGPPAPK ¹⁷⁴	28	3.757.221	2
					258LPLENGR ²⁶⁴	25	3.997.208	2
					293FIFDCVSQEYGIHPER ³⁰⁸	57	6.663.065	3
					316LDTDILLGVTCGLK ³²⁹	36	7.594.163	2
					330TILTLTGVSSLR ³⁴¹	72	6.308.771	2
PREDICTED: alpha-2-macroglobulin isoform X1	31.47/5.00	594093035	222	4	1192ALTEDIYQPR ¹²⁰¹	65	6.033.093	2
Spot 32					1265YGAATFTSATK ¹²⁷⁵	68	5.592.771	2
					1291FQVENSNR ¹²⁹⁸	45	4.972.375	2
					1337KDEFPPFALEVHTLPQTCDGPK ¹³⁵⁷	16	6.080.453	4
					1386MVSGFIPLKPTVK ¹³⁹⁸	6	4.729.409	3
					1386MVSGFIPLKPTVK ¹³⁹⁸	28	4.782.723	3
					1386MVSGFIPLKPTVK ¹³⁹⁸	18	7.169.122	2
Spot 55	71.77/5.09	594093035	691	13	722FDDTSEPPTETVR ⁷³⁴	62	7.473.404	2
					777DTGLGLSPTASLR ⁷⁸⁹	54	6.443.462	2
					790VFQPFVVELTMPYSVIR ⁸⁰⁶	29	10.450.49 0	2
					814ATVLNYLPK ⁸²²	37	5.097.974	2
					898DTIIKPLLVEPEGLEK ⁹¹³	19	5.986.728	3
					898DTIIKPLLVEPEGLEK ⁹¹³	17	8.975.200	2
					914EVIFNSLLCPGAK ⁹²⁷	43	7.679.001	2
					936LPANVVEESAR ⁹⁴⁶	75	5.928.142	2
					1005AILYLNTGYQR ¹⁰¹⁵	48	6.563.540	2

Spot 82

72.58/6.76 594093035 1356 26

¹⁰⁸³ SSGSLNNAK ¹⁰⁹³	33	5.523.030	2
¹¹²⁴ NALFCLDSAWK ¹¹³⁴	41	6.628.196	2
¹¹⁴⁹ ALLAYAFALAGNQR ¹¹⁶³	33	8.044.319	2
¹¹⁴⁹ ALLAYAFALAGNQR ¹¹⁶³	61	8.044.328	2
¹¹⁹² ALTEDIYQPR ¹²⁰¹	59	6.033.092	2
¹²⁶⁵ YGAATFTSATK ¹²⁷⁵	72	5.592.775	2
¹³³⁷ KDEFPPALEVHTLPQTCGPK ¹³⁵⁷	37	6.080.437	4
¹³⁸⁶ MVSGFIPLKPTVK ¹³⁹⁸	24	4.782.724	3
⁷² SLFTDVVAEK ⁸¹	47	5.547.885	2
⁸² DLFHCVSFTLPR ⁹³	31	4.979.087	3
⁸² DLFHCVSFTLPR ⁹³	50	4.979.087	3
⁸² DLFHCVSFTLPR ⁹³	74	7.463.662	2
⁸² DLFHCVSFTLPR ⁹³	34	7.463.682	2
¹⁰⁹ GPTQEFK ¹¹⁵	20	4.036.976	2
¹²⁴ NEESLVFVQTDKPIYKPEQTVNFR ¹⁴⁷	101	7.211.113	4
¹⁴⁸ IVLLDESFHPLNELVPLVYVEDPK ¹⁷¹	16	9.268.216	3
¹⁴⁸ IVLLDESFHPLNELVPLVYVEDPK ¹⁷¹	22	9.268.241	3
¹⁷⁵ IAQWQNLEVENGLQQLTFPLSSEPFQGSYK ²⁰⁴	24	11.512.399	3
²¹⁰ GSGGTAHPFTVEEFVLPK ²²⁸	13	6.679.887	3
²³⁸ IITILEEEVK ²⁴⁷	52	5.938.417	2
²⁴⁸ VSVCGLYTYGKPVGR ²⁶³	63	5.849.640	3
²⁹⁰ FSGQLNNEGCFSSQVNTK ³⁰⁷	27	10.294.594	2
³¹³ RQEFEMK ³¹⁹	25	4.842.291	2
³²⁶ IQEEGTEVELTGK ³³⁸	72	7.168.538	2
³³⁹ GATEITTTITK ³⁴⁹	59	5.683.059	2
³⁵⁰ LSFVTVDNLNR ³⁶⁰	74	6.258.339	2
³⁶² GIPFTGQVLLVDGK ³⁷⁵	89	7.224.046	2
⁴⁹² ELVFYYLIMAK ⁵⁰²	38	7.033.682	2
⁵⁰⁸ SGTHTLPVEQGEMQGHFSIPVPVESDIAPVAR ⁵³⁹	83	8.511.583	4
⁵⁴⁰ LLIYAILPDGEVVGDSAR ⁵⁵⁷	74	9.510.131	2
⁵⁴⁰ LLIYAILPDGEVVGDSAR ⁵⁵⁷	64	9.510.175	2

					⁵⁵⁸ YEVEQCLSNK ⁵⁶⁷	47	6.352.838	2
					⁵⁶⁸ VGLNFSPGQSFPASQAHLR ⁵⁸⁶	78	6.716.702	3
					⁵⁸⁷ VTASPQSLCALR ⁵⁹⁸	45	6.518.359	2
					⁵⁸⁷ VTASPQSLCALR ⁵⁹⁸	96	6.518.373	2
					⁵⁹⁹ AVDQSVLLMRPEAELSAATVYNLLPVK ⁶²⁵	33	9.765.257	3
					⁵⁹⁹ AVDQSVLLMRPEAELSAATVYNLLPVK ⁶²⁵	97	9.818.540	3
					⁵⁹⁹ AVDQSVLLMRPEAELSAATVYNLLPVK ⁶²⁵	50	9.818.553	3
					⁶²⁶ DLSSFPSSVNQQEEDSEGCISR ⁶⁴⁷	33	12.360.300	2
					⁶⁹⁰ ICPQPEEHR ⁶⁹⁸	45	3.891.784	3
Spot 83	100.40/6.2 7	594093035	197	6	²³⁸ IITILEEEVK ²⁴⁷	20	5.938.448	2
					³⁶² GIPFTGQVLLVDGK ³⁷⁵	47	7.224.057	2
					⁵⁴⁰ LLIYAILPDGEVVGDSAR ⁵⁵⁷	45	9.510.154	2
					⁵⁶⁸ VGLNFSPGQSFPASQAHLR ⁵⁸⁶	3	6.716.715	3
					⁷⁷⁷ DTGLGLSPTASLR ⁷⁸⁹	11	6.443.424	2
					⁹⁴⁷ ASFSVLGDILGSAMR ⁹⁶¹	73	7.703.893	2
zinc-alpha-2-glycoprotein precursor	34.38/4.76	77735615	119	14	¹⁰⁹ EGSHTFQGFAGCELR ¹²³	43	5.659.156	3
Spot 33					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	26	8.754.589	2
					¹⁷⁷ AYLEEECPGMLR ¹⁸⁸	50	7.343.345	2
					¹⁷⁷ AYLEEECPGMLR ¹⁸⁸	42	7.423.312	2
Spot 34	35.35/4.73	77735615	151	17	¹⁰⁹ EGSHTFQGFAGCELR ¹²³	25	5.659.161	3
					¹⁰⁹ EGSHTFQGFAGCELR ¹²³	41	5.659.181	3
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	18	8.754.602	2
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	16	8.754.623	2
					¹⁷⁷ AYLEEECPGMLR ¹⁸⁸	50	7.343.363	2
					¹⁷⁷ AYLEEECPGMLR ¹⁸⁸	67	7.423.352	2
					²³¹ SIGLHWTR ²³⁸	25	4.852.636	2
Spot 42	46.09/4.35	77735615	111	11	¹⁰⁹ EGSHTFQGFAGCELR ¹²³	43	5.659.153	3
					¹⁷⁷ AYLEEECPGMLR ¹⁸⁸	55	7.343.330	2
					¹⁷⁷ AYLEEECPGMLR ¹⁸⁸	42	7.423.328	2
					²³¹ SIGLHWTR ²³⁸	14	4.852.641	2
Spot 35	36.57/4.65	594059057	164	20	⁸⁹ AREDIFMETLSDIMDHYK ¹⁰⁶	22	5.622.519	4

					¹⁰⁹ EGSHTFQGAFGCELR ¹²³	46	5.659.176	3
					¹⁴⁴ FDKEIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	39	7.140.329	3
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	25	8.754.606	2
					²³¹ SIGLHWTR ²³⁸	31	4.852.669	2
PREDICTED: zinc-alpha-2-glycoprotein-like	37.90/4.61	594059057	159	20	⁸⁹ AREDIFMETLSDIMDHYK ¹⁰⁶	16	5.622.507	4
Spot 36					¹⁰⁹ EGSHTFQGAFGCELR ¹²³	40	5.659.142	3
					¹⁴⁴ FDKEIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	46	7.140.302	3
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	29	8.754.598	2
					²³¹ SIGLHWTR ²³⁸	27	4.852.645	2
Spot 38	40.63/4.54	594059057	158	28	⁶⁴ RAEPLAPWSQVEGMEDWEK ⁸²	9	7.586.804	3
					⁸⁹ AREDIFMETLSDIMDHYK ¹⁰⁶	24	5.622.467	4
					¹⁰⁹ EGSHTFQGAFGCELR ¹²³	42	5.659.188	3
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	4	8.754.584	2
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	33	8.754.612	2
					¹⁶⁵ WEAEAVYVQR ¹⁷⁴	18	6.258.084	2
					²³¹ SIGLHWTR ²³⁸	33	4.852.642	2
Spot 39	41.90/4.52	594059057	174	20	⁸⁹ AREDIFMETLSDIMDHYK ¹⁰⁶	24	5.622.515	4
					¹⁰⁹ EGSHTFQGAFGCELR ¹²³	50	5.659.177	3
					¹⁴⁴ FDKEIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	46	7.140.338	3
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	25	8.754.610	2
					²³¹ SIGLHWTR ²³⁸	30	4.852.633	2
Spot 40	43.23/4.47	594059057	169	20	⁸⁹ AREDIFMETLSDIMDHYK ¹⁰⁶	13	5.622.476	4
					¹⁰⁹ EGSHTFQGAFGCELR ¹²³	45	5.659.170	3
					¹⁴⁴ FDKEIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	57	7.140.339	3
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	27	8.754.623	2
					²³¹ SIGLHWTR ²³⁸	27	4.852.630	2
Spot 53	65.51/4.81	594059057	119	19	⁸⁹ AREDIFMETLSDIMDHYK ¹⁰⁶	20	5.622.504	4
					¹⁰⁹ EGSHTFQGAFGCELR ¹²³	53	5.659.179	3
					¹⁴⁷ EIPAWVPLDPAAQNTK ¹⁶²	18	8.754.646	2
					²³¹ SIGLHWTR ²³⁸	27	4.852.651	2
PREDICTED: disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 32-like, partial	40.63/4.54	114053071	71	3	⁵⁵⁵ LICTYPLQTPFLR ⁵⁶⁷	18	8119299	2

Spot 38					⁵⁶⁸ DSASVIYAFVR ⁵⁷⁸	54	8119299	2
leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor	46.09/4.35	114051379	83	6	²¹⁶ LHLEGNR ²²²	29	4.197.317	2
Spot 42					²²³ LQVLGEGLLAPQPK ²³⁶	54	7.319.322	2
PREDICTED: leucine-rich alpha-2-glycoprotein	39.24/5.37	594087399	486	30	¹¹⁰ LEDLSPK ¹¹⁶	34	4.012.148	2
Spot 62					¹³² NSLTGLSPGFFR ¹⁴³	21	6.483.398	2
					¹⁴⁴ VSAALCTLVLK ¹⁵⁴	73	5.878.433	2
					¹⁶⁰ FLEASWLHGLK ¹⁷⁰	34	4.342.318	3
					¹⁶⁰ FLEASWLHGLK ¹⁷⁰	36	6.508.526	2
					²¹⁶ GPLNLER ²²²	46	3.997.217	2
					²²³ LHLEGNR ²²⁹	23	4.197.243	2
					²³⁰ LQVLGEGLLAPQPK ²⁴³	76	7.319.334	2
					²⁴⁶ YLFLNDNR ²⁵³	58	5.277.646	2
					²⁴⁶ YLFLNDNR ²⁵³	56	5.277.666	2
					²⁵⁴ LASVAASAFR ²⁶³	39	4.967.765	2
					²⁵⁴ LASVAASAFR ²⁶³	14	4.967.765	2
					³¹⁹ WLVANEDK ³²⁶	23	4.877.484	2
					³⁴³ GQTLAAAESH ³⁵³	57	5.492.807	2
Spot 63	41.03/5.01	594087399	597	36	¹¹⁰ LEDLSPK ¹¹⁶	6	4.012.197	2
					¹¹⁷ FLLPVPQLK ¹²⁵	19	5.278.336	2
					¹³² NSLTGLSPGFFR ¹⁴³	45	6.483.417	2
					¹⁴⁴ VSAALCTLVLK ¹⁵⁴	50	5.878.490	2
					¹⁶⁰ FLEASWLHGLK ¹⁷⁰	56	4.342.355	3
					¹⁶⁰ FLEASWLHGLK ¹⁷⁰	57	6.508.582	2
					¹⁶⁰ FLEASWLHGLK ¹⁷⁰	34	6.508.582	2
					²¹⁶ GPLNLER ²²²	45	3.997.252	2
					²²³ LHLEGNR ²²⁹	34	4.197.293	2
					²³⁰ LQVLGEGLLAPQPK ²⁴³	72	7.319.363	2
					²³⁰ LQVLGEGLLAPQPK ²⁴³	77	7.319.403	2
					²⁴⁶ YLFLNDNR ²⁵³	59	5.277.690	2
					²⁵⁴ LASVAASAFR ²⁶³	71	4.967.823	2
					²⁹⁸ DGFDISNNPWICDQNLADLYR ³¹⁸	44	12.635.80	2

					³⁴³ GQTLAAEAESH ³⁵³	90	5.492.846	2
PREDICTED: alpha-1B-glycoprotein	62.96/4.60	594087719	112	12	⁸¹ FPLGPVTSATR ⁹¹	50	5.733.186	2
Spot 48					⁴⁴⁵ AGEEEPLAVAWSTHR ⁴⁵⁹	32	5.515.984	3
					⁴⁶⁰ SADLVLTSVGPPQHAGTYSCR ⁴⁷⁹	25	7.070.077	3
					⁴⁸² TGWPHSLLSESDPVELR ⁴⁹⁹	6	6.793.447	3
PREDICTED: galectin-3-binding protein isoform X1	69.38/4.53	594081110	78	5	²³⁰ FASAYQAK ²³⁷	5	4.432.241	2
Spot 49					⁴⁸² SNPTIGYENR ⁴⁹¹	40	5.757.745	2
					⁴⁸² SNPTIGYENR ⁴⁹¹	5	5.757.772	2
					⁵²⁵ STSLFPCPAGFFSR ⁵³⁸	29	7.873.770	2
					⁵²⁵ STSLFPCPAGFFSR ⁵³⁸	33	7.873.782	2
heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor	72.43/4.69	84579841	97	1	³⁸⁸ GVVDSEDIPLNLSR ⁴⁰¹	97	7.573.944	2
Spot 50								
fibulin1 precursor	83.11/4.54	148232266	237	7	¹⁶⁷ VSEIEEQEDPYLNDR ¹⁸²	46	9.829.375	2
Spot 51					³⁴⁷ GYHLNEEGTR ³⁵⁶	41	5.882.741	2
					³⁸⁹ AGYYFDGISR ³⁹⁸	45	5.747.679	2
					³⁹⁹ TCVDINECR ⁴⁰⁷	58	5.837.459	2
					⁶⁵⁴ YMDGMTVGVR ⁶⁶⁴	47	6.302.900	2
angiotensin-converting enzyme	77.61/4.75	449408	638	11	⁷²³ KIQDLR ⁷²⁹	42	4.512.562	2
Spot 52					⁷⁶⁶ LEPDLTNLMATSR ⁷⁷⁸	83	7.308.718	2
					⁷⁶⁶ LEPDLTNLMATSR ⁷⁷⁸	64	7.388.688	2
					⁷⁶⁶ LEPDLTNLMATSR ⁷⁷⁸	68	7.388.699	2
					⁷⁷⁹ NYQDLAWAWK ⁷⁸⁸	45	6.478.085	2
					⁷⁹⁷ SILPYFPK ⁸⁰⁴	21	4.827.740	2
					⁸⁰⁵ YVELTNK ⁸¹¹	23	4.337.289	2
					⁸¹⁵ LNGYQDGGDSWR ⁸²⁶	13	6.842.971	2
					⁹⁰⁴ MDATEAMIK ⁹¹²	8	5.132.295	2
					⁹⁰⁴ MDATEAMIK ⁹¹²	47	5.212.300	2
					⁹⁴⁴ SMLEKPTDGR ⁹⁵³	45	3.838.508	3
					⁹⁴⁴ SMLEKPTDGR ⁹⁵³	46	5.752.785	2
					¹⁰⁰¹ DLPVTFR ¹⁰⁰⁷	39	4.242.336	2
					¹⁰⁷⁶ VFDGSVTR ¹⁰⁸³	66	4.407.254	2

					1084	ENYNQEWWSLR ¹⁰⁹⁴	31	7.628.362	2
					1084	ENYNQEWWSLR ¹⁰⁹⁴	61	7.628.480	2
					1095	LKYQGVCPPLAR ¹¹⁰⁶	38	4.679.228	3
					1097	YQGVCPPLAR ¹¹⁰⁶	37	5.807.958	2
					1117	FHIPASVPYVR ¹¹²⁷	27	6.433.558	2
					1166	LLADAMK ¹¹⁷²	11	3.892.099	2
					1173	LGFSQPWPEAMR ¹¹⁸⁴	40	7.098.456	2
					1173	LGFSQPWPEAMR ¹¹⁸⁴	28	7.178.439	2
PREDICTED: 72 kDa type IV collagenase	65.36/4.88	594059195	192	12	129	IIGYTPDLDPQTVDDAFAR ¹⁴⁷	28	10.540.205	2
Spot 53					226	YGNADGEYCK ²³⁵	32	5.887.327	2
					244	EYTSCTDIGR ²⁵³	48	6.012.626	2
					298	FQGTSYDSCTTEGR ³¹¹	32	8.048.331	2
					521	IDAVYEDPQEEK ⁵³²	14	7.183.306	2
					569	VDAAFNWSK ⁵⁷⁷	12	5.192.531	2
					581	TYIFAGDK ⁵⁸⁸	26	4.577.328	2
PREDICTED: melanotransferrin isoform X1	73.14/4.83	594060347	1369	46	123	GSQVTINTLK ¹³²	40	5.307.969	2
Spot 54					144	TVGWNVPVGYLVESGR ¹⁵⁹	93	8.669.515	2
					144	TVGWNVPVGYLVESGR ¹⁵⁹	67	8.669.539	2
					160	LSVMGCDVLR ¹⁶⁹	68	5.832.804	2
					198	GDSTGEGVCDKSPLER ²¹³	83	5.695.878	3
					214	YYDYSGAFR ²²²	41	5.712.479	2
					223	CLAEGAGDVAFVK ²³⁵	79	6.688.301	2
					236	HSTVLENTDGK ²⁴⁶	87	6.007.934	2
					247	TLPSWGQALLSQDFELLCQDGTR ²⁶⁹	48	8.790.936	3
					247	TLPSWGQALLSQDFELLCQDGTR ²⁶⁹	20	13.181.451	2
					283	VPAHAVVVR ²⁹¹	39	4.742.903	2
					292	ADTDGGLIFR ³⁰¹	103	5.327.655	2
					302	LLNEGQR ³⁰⁸	38	4.152.244	2
					309	LFSHEGSSFHMFSEAYGQK ³²⁸	10	5.737.536	4
					334	DATSELVPIATQTYEAWLGR ³⁵³	54	7.410.379	3
					354	EYLHAMK ³⁶⁰	5	4.542.166	2

						³⁷⁵ WCVLSTPEIQK ³⁸⁵	57	6.808.472	2
						³⁹⁸ LKPEIQCVSAESPQQCMER ⁴¹⁶	44	7.693.509	3
						⁴¹⁷ IQAGQIDAVTLK ⁴²⁸	55	6.288.571	2
						⁴¹⁷ IQAGQIDAVTLKGEDIYTAGK ⁴³⁷	89	7.310.526	3
						⁴³⁸ TYGLVPAAGEHYTR ⁴⁵¹	46	5.122.518	3
						⁴³⁸ TYGLVPAAGEHYTR ⁴⁵¹	42	7.678.859	2
						⁴⁸² SCHPGFGSPAGWDIPVGALVQR ⁵⁰³	49	7.700.420	3
						⁵¹⁰ DCDVLTAVSEFFSASCVPVNNPK ⁵³²	26	8.527.258	3
						⁵¹⁰ DCDVLTAVSEFFSASCVPVNNPK ⁵³²	31	12.785.93 4	2
						⁵¹⁰ DCDVLTAVSEFFSASCVPVNNPK ⁵³²	25	12.785.95 3	2
						⁵³³ NYPSSLCALCVGDEQGR ⁵⁴⁹	75	9.634.267	2
						⁵⁶⁰ YYGHSGAFR ⁵⁶⁸	52	3.531.601	3
						⁵⁶⁹ CLVENAGDVAFVK ⁵⁸¹	70	7.113.549	2
						⁶⁶⁷ MFDSSSYHGQDLLFK ⁶⁸¹	15	5.975.997	3
PREDICTED: melanotransferrin isoform X1	70.47/5.22	594060347	825	32		¹⁴⁴ TVGWNVPVGYLVESGR ¹⁵⁹	80	8.669.570	2
Spot 55						¹⁶⁰ LSVMGCDVLR ¹⁶⁹	67	5.832.844	2
						¹⁷⁰ AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESLCR ¹⁹⁴	45	13.285.68 1	2
						²¹⁴ YYDYSGAFR ²²²	32	5.712.494	2
						²³⁶ HSTVLENTDGK ²⁴⁶	95	6.007.933	2
						²⁸³ VPAHAVVVR ²⁹¹	33	4.742.911	2
						²⁹² ADTDGGLIFR ³⁰¹	103	5.327.701	2
						²⁹² ADTDGGLIFR ³⁰¹	13	5.327.736	2
						³⁰² LLNEGQR ³⁰⁸	42	4.152.251	2
						³⁰⁹ LFSHEGSSFHMFSSSEAYGQK ³²⁸	14	5.737.548	4
						³³⁴ DATSELVPIATQTYEAWLGR ³⁵³	43	7.410.389	3
						³³⁴ DATSELVPIATQTYEAWLGR ³⁵³	26	11.110.64 7	2
						³⁷⁵ WCVLSTPEIQK ³⁸⁵	44	6.808.480	2
						⁴¹⁷ IQAGQIDAVTLK ⁴²⁸	55	6.288.618	2
						⁴²⁹ GEDYTAGK ⁴³⁷	42	4.772.288	2
						⁴²⁹ GEDYTAGK ⁴³⁷	30	4.772.288	2

					⁴³⁸ TYGLVPAAGEHYTR ⁴⁵¹	48	5.122.520	3
					⁴⁸² SCHPGFGSPAGWDIPVGALVQR ⁵⁰³	51	7.700.434	3
					⁵¹⁰ DCDVLTAVSEFFSASCVPVNNPK ⁵³²	20	12.785.958	2
					⁶⁶⁷ MFDSSSYHGQDLLFK ⁶⁸¹	14	5.976.010	3
carboxypeptidase Q precursor	55.28/5.18	115495837	105	5	⁶⁷ LALLVDTVGPR ⁷⁷	60	5.773.469	2
Spot 56					⁹⁷ GDGLENVHLEPVK ¹⁰⁹	26	4.695.747	3
					⁹⁷ GDGLENVHLEPVK ¹⁰⁹	45	7.038.676	2
Spot 57	57.42/5.05	115495837	425	19	³² TFQEIKEEIAHYGDVAK ⁴⁸	21	6.599.952	3
					³⁸ EEIAHYGDVAK ⁴⁸	51	6.163.041	2
					⁶⁷ LALLVDTVGPR ⁷⁷	78	5.773.470	2
					⁸⁷ AIEIMQQNLK ⁹⁶	8	5.943.239	2
					⁸⁷ AIEIMQQNLK ⁹⁶	39	6.023.256	2
					⁹⁷ GDGLENVHLEPVK ¹⁰⁹	40	4.695.747	3
					⁹⁷ GDGLENVHLEPVK ¹⁰⁹	80	7.038.666	2
					¹⁹⁷ VGALASLIR ²⁰⁵	74	4.502.851	2
					²²⁹ IPTACITVEDAEMMSR ²⁴⁴	5	9.284.168	2
					²⁶² SYPDADSFNTVAEITGSK ²⁷⁹	77	9.514.418	2
PREDICTED: serum albumin	55.89/4.67	594045062	537	29	³⁵ FKDLGEEHFK ⁴⁴	17	4.172.092	3
Spot 58					⁴⁵ GLVLIAFSQYLQQSPYDEHVK ⁶⁵	25	8.124.236	3
					⁶⁶ LVNELTEFAK ⁷⁵	42	5.823.190	2
					⁷⁶ TCVADESHAGCDK ⁸⁸	6	4.838.567	3
					⁸⁹ SLHTLFGHEELCK ¹⁰⁰	21	4.785.695	3
					¹⁶¹ YLYEIAR ¹⁶⁷	28	4.642.520	2
					²¹⁰ EKVLTSAR ²¹⁸	22	4.957.779	2
					²⁴⁹ AEFVEVTK ²⁵⁶	13	4.617.438	2
					³⁴⁷ DAFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	21	7.843.933	2
					⁴⁰² HLVDEPQNLIK ⁴¹²	35	6.533.643	2
					⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	99	7.404.114	2
					⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	71	5.473.174	3
					⁴⁶⁹ MPCTEDYLSLILNR ⁴⁸²	90	8.709.210	2
					⁴⁸³ LCVLHEK ⁴⁸⁹	21	4.497.453	2

Spot 69

62.44/5.59 594045062 1225 43

⁵⁰⁸ RPCFSALTPDETYVPK ⁵²³	27	6.276.417	3
³⁵ FKDLGEEHFK ⁴⁴	22	4.172.041	3
⁷⁶ TCVADESHAGCDK ⁸⁸	67	4.838.578	3
⁷⁶ TCVADESHAGCDK ⁸⁸	10	7.252.910	2
⁸⁹ SLHTLFGHEELCK ¹⁰⁰	69	7.173.562	2
¹⁰⁶ ETYGDMADCCEK ¹¹⁷	56	7.477.605	2
¹²⁹ HKDDSPDLPK ¹³⁸	29	3.845.211	3
¹⁶¹ YLYEIAR ¹⁶⁷	32	4.642.432	2
²⁴⁹ AEFVEVTK ²⁵⁶	45	4.617.422	2
²⁵⁷ LVTDLTK ²⁶³	39	3.952.318	2
²⁸⁶ YICDNQDTISSK ²⁹⁷	64	7.223.220	2
²⁹⁸ LKECCDKP LLEK ³⁰⁹	19	5.115.918	3
³¹⁰ SHCIAEAEK ³¹⁸	33	5.227.387	2
³¹⁹ DAVPENLPALTADFAEDKEVCK ³⁴⁰	31	8.113.885	3
³⁴⁷ DAFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	41	7.843.756	2
³⁴⁷ DAFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	67	7.843.762	2
³⁷⁵ EYEATLEECCA K ³⁸⁶	60	7.518.078	2
⁴⁰² HLVDEPQNLIK ⁴¹²	50	6.533.562	2
⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	113	7.404.006	2
⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	49	7.404.019	2
⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	79	5.473.087	3
⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	56	8.204.682	2
⁴⁵² SLGVVGTK ⁴⁵⁹	32	3.807.260	2
⁴⁶⁹ MPCTEDYLSLILNR ⁴⁸²	13	5.809.501	3
⁴⁶⁹ MPCTEDYLSLILNR ⁴⁸²	84	8.709.219	2
⁴⁸³ LCVLHEK ⁴⁸⁹	22	4.497.417	2
⁵⁰⁸ RPCFSALTPDETYVPK ⁵²³	36	6.276.381	3
⁵⁴⁸ KQTALVELLK ⁵⁵⁷	58	5.718.563	2
⁵⁴⁹ QTALVELLK ⁵⁵⁷	39	5.078.100	2
⁵⁶⁹ TVMENFVAFV DK ⁵⁸⁰	75	7.003.508	2
⁵⁶⁹ TVMENFVAFV DK ⁵⁸⁰	80	7.083.452	2
⁶⁶ LVNELTEFAK ⁷⁵	59	5.823.153	2

Spot 70

62.86/5.48 594045062 509 26

Spot 71

63.10/5.39 594045062 816 32

⁶⁶ LVNELTEFAK ⁷⁵	34	5.823.159	2
⁸⁹ SLHTLFGHEELCK ¹⁰⁰	13	7.173.538	2
¹²⁹ HKDDSPDLPK ¹³⁸	19	3.845.200	3
¹⁶¹ YLYEIAR ¹⁶⁷	30	4.642.470	2
²⁴⁹ AEFVEVTK ²⁵⁶	32	4.617.451	2
²⁵⁷ LVTDLTK ²⁶³	18	3.952.352	2
²⁸⁶ YICDNQDTISSK ²⁹⁷	73	7.223.231	2
³⁴⁷ DAFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	37	7.843.729	2
⁴⁰² HLVDEPQNLIK ⁴¹²	47	6.533.608	2
⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	35	7.403.998	2
⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	54	5.473.110	3
⁵⁰⁸ RPCFSALTPDETYVPK ⁵²³	9	6.276.382	3
⁵²⁹ LFTFHADICTLPDTEK ⁵⁴⁴	5	6.366.392	3
⁵⁶⁹ TMENFVAFVVK ⁵⁸⁰	78	7.083.458	2
³⁵ FKDLGEEHFK ⁴⁴	8	4.172.096	3
⁶⁶ LVNELTEFAK ⁷⁵	34	5.823.157	2
⁶⁶ LVNELTEFAK ⁷⁵	59	5.823.162	2
⁸⁹ SLHTLFGHEELCK ¹⁰⁰	25	4.785.687	3
¹²⁹ HKDDSPDLPK ¹³⁸	13	3.845.221	3
¹⁶¹ YLYEIAR ¹⁶⁷	25	4.642.459	2
²⁴⁹ AEFVEVTK ²⁵⁶	32	4.617.443	2
²⁵⁷ LVTDLTK ²⁶³	26	3.952.343	2
²⁸⁶ YICDNQDTISSK ²⁹⁷	68	7.223.237	2
²⁹⁸ LKECCDKP LLEK ³⁰⁹	24	5.115.920	3
³⁴⁷ DAFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	69	7.843.742	2
³⁴⁷ DAFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	56	7.843.753	2
⁴⁰² HLVDEPQNLIK ⁴¹²	47	6.533.581	2
⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	85	7.404.001	2
⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	50	7.404.009	2
⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	60	5.473.076	3
⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	17	8.204.708	2
⁴³⁸ VPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	59	7.564.239	2

Spot 86

62.31/6.74 594045062 937 35

⁴⁶⁹ MPCTEDYLSLILNR ⁴⁸²	92	8.709.152	2
⁴⁶⁹ MPCTEDYLSLILNR ⁴⁸²	90	8.709.168	2
⁵⁰⁸ RPCFSALTPDETYVPK ⁵²³	32	6.276.401	3
⁵²⁹ LFTFHADICTLPDTEK ⁵⁴⁴	14	6.366.379	3
⁵⁶⁹ TMENFVAFVVK ⁵⁸⁰	80	7.083.464	2
³⁵ FKDLGEEHFK ⁴⁴	23	4.172.052	3
⁸⁹ SLHTLFGHEELCK ¹⁰⁰	67	7.173.550	2
¹²⁹ HKDDSPDLPK ¹³⁸	34	3.845.195	3
¹³⁹ LKPDNPTLCAEFK ¹⁵¹	23	5.115.922	3
¹⁶¹ YLYEIAR ¹⁶⁷	31	4.642.466	2
²⁴⁹ AEFVEVTK ²⁵⁶	33	4.617.441	2
²⁵⁷ LVTDLTK ²⁶³	39	3.952.336	2
²⁸⁶ YICDNQDTISSK ²⁹⁷	68	7.223.231	2
³⁴⁷ DAFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	66	7.843.723	2
³⁴⁷ DAFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	62	7.843.742	2
⁴⁰² HLVDEPQNLIK ⁴¹²	41	6.533.594	2
⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	113	7.403.983	2
⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	56	5.473.095	3
⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵⁹	42	8.204.690	2
⁴⁵² SLGVVGTK ⁴⁵⁹	24	3.807.263	2
⁴⁶⁹ MPCTEDYLSLILNR ⁴⁸²	59	8.709.158	2
⁴⁶⁹ MPCTEDYLSLILNR ⁴⁸²	111	8.709.193	2
⁴⁸³ LCVLHEK ⁴⁸⁹	23	4.497.406	2
⁵⁰⁸ RPCFSALTPDETYVPK ⁵²³	25	6.276.395	3
⁵²⁹ LFTFHADICTLPDTEK ⁵⁴⁴	13	6.366.376	3
⁵⁴⁸ KQTALVELLK ⁵⁵⁷	24	5.718.580	2
⁵⁴⁹ QTALVELLK ⁵⁵⁷	37	5.078.107	2
⁵⁶⁹ TMENFVAFVVK ⁵⁸⁰	71	7.003.489	2
⁵⁶⁹ TMENFVAFVVK ⁵⁸⁰	88	7.083.435	2
⁶⁶ LVNELTEFAK ⁷⁵	59	5.823.165	2
⁶⁶ LVNELTEFAK ⁷⁵	44	5.823.169	2
⁸⁹ SLHTLFGHEELCK ¹⁰⁰	24	4.785.692	3

Spot 101

61.23/9.05 594045062 609 24

					¹²⁹ HKDDSPDLPK ¹³⁸	21	3.845.207	3
					¹³⁹ LKPDPNLCAEFK ¹⁵¹	25	5.115.929	3
					⁴⁴⁹ AEFVEVTK ²⁵⁶	32	4.617.446	2
					²⁵⁷ LVTDLTK ²⁶³	31	3.952.364	2
					²⁸⁶ YICDNQDTISSK ²⁹⁷	73	7.223.245	2
					³⁶⁰ RHPEYAVSVLLR ³⁷¹	35	4.806.029	3
					⁴⁰² HLVDEPQNLIK ⁴¹²	37	6.533.612	2
					⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	61	7.403.997	2
					⁴²¹ LGEYGFQNALIVR ⁴³³	86	7.404.014	2
					⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	60	5.473.120	3
					⁴³⁷ KVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	26	8.204.805	2
					⁴³⁸ VPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	9	7.564.233	2
					⁵⁰⁸ RPCFSALTPDETYVPK ⁵²³	35	6.276.401	3
					⁵⁶⁹ TMENFVAFVDK ⁵⁸⁰	94	7.083.453	2
serum albumin, partial	63.36/5.31	597718071	185	7	²³³ IVTDLTK ²³⁹	31	3.952.356	2
Spot 72					²⁶² YICDNQDTLSSK.L	60	7.223.232	2
					³⁷⁸ HLVDEPQNLIK.Q	36	6.533.622	2
Spot 73	63.62/5.14	597718071	109	3	⁵⁴⁵ TMENFVAFVDK.C	59	7.083.460	2
					²⁶² YICDNQDTLSSK.L	73	7.223.273	2
					³⁷⁸ HLVDEPQNLIK.Q	36	6.533.638	2
Serum albumin	69.70/5.61	229552	94	5	⁴² LVNELTEFAK.T	38	5.823.124	2
Spot 74					¹³⁷ YLYEIAR.R	24	4.642.457	2
					³²² DAFLGSFLYEYSR.R	32	7.843.740	2
PREDICTED: alpha-1-anti-proteinase-like isoform X1	55.56/4.74	594050476	167	14	¹⁴⁸ LVDTFLEDVK.N	42	5.898.197	2
Spot 58					¹⁹⁷ VLDPNTVFALVNYISFK.G	5	9.705.319	2
					³¹³ LSISETYDLK.T	56	5.848.094	2
					³²³ TVLGDVGITEVFSNAADLSGVTK.E	65	11.471.090	2
PREDICTED: serpin A-33-like	58.27/4.78	594074015	72	5	³²⁹ IFGNADLSGITGTR.D	30	7.113.606	2
Spot 58					³⁹⁶ DTQSIIFLGK.V	41	5.613.133	2
PREDICTED: dipeptidyl peptidase 2	55.12/4.82	594077778	120	11	²²⁴ AVQDAFR.Q	39	4.037.101	2
Spot 58					²⁵⁹ DLTQLFGFAR.N	36	5.843.145	2

					²⁶⁹ NAFTVLAMMDYPYATDFVGHLP AHPVQVACSR. L	11	9.034.167	4
					³⁰¹ LLSESSR.I	33	3.962.132	2
PREDICTED: vitamin D-binding protein Spot 58	58.16/4.86	594092100	180	12	²⁴³ VPTAHLEDVLP LAEDITTILSK.C ²⁸⁴ LCDNLSTK.N ³⁴¹ VLDQYIFELSR.K ⁴²⁷ GKFPDATETDLQELIAK.R	58 26 76 21	7.924.394 4.757.441 6.918.704 6.259.982	3 2 2 3
T-complex protein 1 subunit epsilon Spot 60	56.35/5.61	274325364	130	14	²⁴⁸ IAILTCPFEPKPK.T ²⁶⁴ HKLDVTSVEDFK.A ²⁹⁴ ETGANLAICQWGFDDDEANHLLLQNDLPAVR.W ³²⁴ WVGGPEIELIAIATGGR.I ³²⁴ WVGGPEIELIAIATGGR.I ³⁴⁵ FSELTAEK ³⁵²	18 25 23 47 47 17	5.376.358 4.732.527 11.275.438 8.699.791 8.699.819 4.627.351	3 3 3 2 2 2
PREDICTED: T-complex protein 1 subunit delta Spot 87	49.39/7.97	555955259	128	13	⁹ TGPPAGAVGAAGAAGGR ²⁵ ²⁵² IGLIQFCLSAPK ²⁶³ ⁴²⁶ ALIAGGGAPEIELALR ⁴⁴¹ ⁴⁵⁹ AFADAMEVIPSTLAENAGLNPISTVTELR ⁴⁸⁷	49 18 48 13	6.693.479 6.738.745 7.759.435 10.161.822	2 2 2 3
gelsolin isoform b Spot 64	44.39/4.84	77736201	348	15	⁴⁸⁰ EPAHLSLFGGKPMIYR ⁴⁹⁷ ⁵⁰³ EGGQTAPASTR ⁵¹³ ⁵⁰³ EGGQTAPASTR ⁵¹³ ⁵³⁴ AGALNSNDAFVLK ⁵⁴⁶ ⁵³⁴ AGALNSNDAFVLK ⁵⁴⁶ ⁵⁴⁷ TPSAAYLWVGAGASEAEK ⁵⁶⁴ ⁵⁷⁶ AQPVQVAEGSEPDFSWEALGGK ⁵⁹⁷ ⁵⁷⁶ AQPVQVAEGSEPDFSWEALGGK ⁵⁹⁷ ⁶¹⁸ LFACSNK ⁶²⁴ ⁶⁶³ DSQEEKTEALTSK ⁶⁷⁷ ⁶⁶³ DSQEEKTEALTSK ⁶⁷⁷ ⁶⁷⁹ YIETDPANR ⁶⁸⁷	18 15 18 59 85 64 26 27 31 6 49 57	6.980.178 5.377.626 5.377.670 6.603.520 6.603.527 9.044.476 11.515.574 11.515.582 4.202.078 5.559.273 8.333.948 5.397.598	3 2 2 2 2 2 2 2 2 3 2 2
glutaminyl-peptide cyclo-transferase precursor	37.84/6.02	29135303	226	17	⁷⁸ YPGSPGSFAAR ⁸⁸	76	5.552.657	2

Spot 65						¹¹⁹ SFSNIISTLNPTAK ¹³²	25	7.469.027	2
						²²³ MASTPHPPGAR ²³³	36	3.745.134	3
						²²³ MASTPHPPGAR ²³³	11	5.692.719	2
						²⁷¹ LEAIEHGLR ²⁷⁹	29	3.465.204	3
						²⁷¹ LEAIEHGLR ²⁷⁹	32	5.192.866	2
						²⁹⁶ NYGYGGVIQDDHIPFLR ³¹²	57	6.553.185	3
						²⁹⁶ NYGYGGVIQDDHIPFLR ³¹²	33	6.553.188	3
PREDICTED: transcription factor HES1, partial	37.99/5,70	667347883	42	11		¹ SSR ³		3.491.267	1
Spot 66						¹ SSR ³		3.491.780	1
						⁴ HSK ⁶		3.711.041	1
						⁴ HSK ⁶		3.712.289	1
						⁴ HSKLEK ⁹		3.712.287	2
						¹⁹ HLR ²¹		4.252.170	1
RecName: Full=Spermadhesin Z13	93.74/5.61	12585540	82	17		⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	49	5.915.002	4
Spot 78						⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	16	7.883.397	3
						⁷⁸ ICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	34	7.403.100	3
						⁷⁸ ICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	34	7.456.403	3
Spot 98	19.68/5.63	12585540	65	17		⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	39	5.915.057	4
						⁷⁸ ICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	27	7.403.195	3
						⁷⁸ ICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	20	7.456.464	3
Spot 133	11.98/7.10	12585540	148	17		⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	54	5.875.032	4
						⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	54	5.875.078	4
						⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	67	7.830.125	3
						⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	42	5.915.043	4
						⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	45	5.915.057	4
						⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	67	7.883.438	3
						⁷⁸ ICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	36	7.403.123	3
						⁷⁸ ICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	81	7.403.141	3
						⁷⁸ ICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	34	7.456.458	3
Spot 134	12.08/6.32	12585540	144	17		⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	57	5.875.064	4
						⁷⁷ KICDTSHA EYTSCTNTMTVK ⁹⁶	57	7.830.168	3

Spot 138	12.47/5.62	12585540	155	17	⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	63	7.883.449	3
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	81	7.403.149	3
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	60	11.099.73	2
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	42	7.456.438	3
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	64	5.875.048	4
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	66	7.830.130	3
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	45	5.915.040	4
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	59	7.883.441	3
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	42	7.403.047	3
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	89	11.099.74	2
Spot 140	12.33/5.20	12585540	113	17	⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	36	7.456.441	3
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	57	5.875.045	4
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	59	7.830.141	3
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	62	5.915.053	4
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	60	7.883.420	3
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	51	7.403.130	3
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	33	7.456.446	3
Spot 142	12.42/4.96	12585540	73	17	⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	46	5.915.093	4
					⁷⁷ KICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	2	7.883.551	3
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	20	7.403.145	3
					⁷⁸ ICDTSHAEYTSCTNTMTVK ⁹⁶	27	7.456.453	3
PREDICTED: polymeric immunoglobulin receptor	69.54/5.78	594038508	156	6	¹⁴⁷ TVTINCPFTR ¹⁵⁶	45	6.047.949	2
Spot 80					²³¹ SNVDLQVLKPEPELVYGDLR ²⁵⁰	30	7.620.471	3
					³⁶³ GGSVTVSCPYNPK ³⁷⁵	50	6.833.113	2
					⁴⁵⁶ VVEGEPSLK ⁴⁶⁴	30	4.792.429	2
Spot 81	69.39/6.14	594038508	154	6	¹⁴⁷ TVTINCPFTR ¹⁵⁶	35	6.047.958	2
					²³¹ SNVDLQVLKPEPELVYGDLR ²⁵⁰	39	7.620.525	3
					³⁶³ GGSVTVSCPYNPK ³⁷⁵	39	6.833.119	2
					⁴⁵⁶ VVEGEPSLK ⁴⁶⁴	41	4.792.542	2
PREDICTED: beta-glucuronidase isoform X1	69.84/6.22	594094181	56	5	⁴¹ ELDGLWSFR ⁴⁹	29	5.617.746	2
Spot 81					²⁰⁶ FDFFNAGLHR ²¹⁶	6	4.628.782	3

					³⁸³ TSHYPYAEVQLQCDR ³⁹⁸	20	6.609.605	3
PREDICTED: complement factor H-like, partial	100.76/6.1 3	594054661	62	7	⁷¹ WVSLNPSR ⁷⁸	33	4.797.557	2
Spot 83					²¹² TPVILNGQAVLPK ²²⁴	29	6.754.049	2
PREDICTED: serotransferrin isoform X1	67.51/7.54	594054424	250	9	¹⁵⁶ ELPDPQESIQR ¹⁶⁶	36	6.563.244	2
Spot 84					²⁶⁹ VPSHAVVAR ²⁷⁷	19	3.125.141	3
					⁵⁴⁰ YYGYTGAFR ⁵⁴⁸	33	5.492.511	2
					⁵⁴⁰ YYGYTGAFR ⁵⁴⁸	48	5.492.518	2
					⁵⁶¹ DQTVLENTDER ⁵⁷¹	54	6.603.048	2
					⁶³⁷ SVTDCTSNFCLFR ⁶⁴⁹	31	8.038.480	2
					⁶⁷¹ TYDSYLGDDYVR ⁶⁸²	62	7.338.239	2
Spot 85	63.95/7.44	594054424	372	20	⁴⁸ IFENGPVFCVK ⁵⁹	24	6.988.482	2
					¹⁸⁸ LCQLCAGK ¹⁹⁵	22	4.752.320	2
					²³⁰ HSTVFDNLPNPEDRK ²⁴⁴	20	5.902.962	3
					³⁰⁰ DKPDNFQLFQSPHGK ³¹⁴	9	5.866.226	3
					⁴⁸⁰ TAGWNIPMGLLYSK ⁴⁹³	22	7.839.041	2
					⁴⁹⁹ FDEFFSAGCAPGSPR ⁵¹³	54	8.228.591	2
					⁵²¹ ECVPNSNER ⁵³⁹	58	5.527.409	2
					⁵⁴⁰ YYGYTGAFR ⁵⁴⁸	32	5.492.528	2
					⁵⁶¹ DQTVLENTDER ⁵⁷¹	64	6.603.048	2
					⁵⁷⁹ NLHKEDFDVLCK ⁵⁹⁰	24	5.065.804	3
					⁶⁰⁸ APNHAVVSR ⁶¹⁶	32	3.175.083	3
					⁶³⁷ SVTDCTSNFCLFR ⁶⁴⁹	15	8.038.571	2
PREDICTED: epididymis-specific alpha-mannosidase-like, partial	64.42/7.27	594034671	76	4	¹⁸³ MEIVEGPLVTEIR ¹⁹⁵	27	7.514.001	2
Spot 85					²³⁷ VGPLELNR ²⁴⁴	48	4.492.578	2
UTP-glucose-1-phosphate uridylyl-transferase	52.06/7.88	41386780	109	6	⁹⁶ GLPDNVSSVLNK ¹⁰⁷	10	6.218.333	2
Spot 87					³⁷⁸ SFENSLGINVPR ³⁸⁹	75	6.668.447	2
					⁴²³ EFPTVPLVK ⁴³¹	23	5.152.987	2
glucose-6-phosphate isomerase	52.09/8.00	94966765	51	5	¹⁹⁵ TLATLNPESLFIASK ²¹¹	34	9.030.070	2
Spot 87					⁴²⁴ ILLANFLAQTEALMR ⁴³⁸	18	8.604.774	2
alpha-enolase	45.42/7.23	87196501	431	25	¹⁶ GNPTVEVDLFTAK ²⁸	84	6.958.640	2

Spot 89					³³ AAVPSGASTGIYEALELR ⁵⁰	132	9.029.787	2
					¹⁸⁴ IGAEVYHNLK ¹⁹³	24	5.723.192	2
					²⁰³ DATNVGDEGGFAPNILENK ²²¹	9	9.809.696	2
					²⁴⁰ VVIGMDVAASEFYR ²⁵³	60	7.868.919	2
					²⁷⁰ YITPDELANLYK ²⁸¹	56	7.203.747	2
					³⁴⁴ VNQIGSVTESLQACK ³⁵⁸	41	8.174.172	2
					⁴¹³ IEEELGSK ⁴²⁰	25	4.527.336	2
Spot 90	45.47/6.83	87196501	456	28	¹⁶ GNPTVEVDLFTAK ²⁸	18	6.958.655	2
					¹⁶ GNPTVEVDLFTAK ²⁸	73	6.958.659	2
					³³ AAVPSGASTGIYEALELR ⁵⁰	114	9.029.803	2
					⁷² TIAPALVSK ⁸⁰	7	4.502.818	2
					⁸¹ KLNVVEQEK ⁸⁹	25	5.438.118	2
					¹⁶³ LAMQEFMILPVGAENFR ¹⁷⁹	69	9.994.979	2
					¹⁶³ LAMQEFMILPVGAENFR ¹⁷⁹	31	9.994.996	2
					¹⁸⁴ IGAEVYHNLK ¹⁹³	7	3.818.714	3
					²⁴⁰ VVIGMDVAASEFYR ²⁵³	45	7.868.926	2
					²⁴⁰ VVIGMDVAASEFYR ²⁵³	45	7.868.931	2
					²⁷⁰ YITPDELANLYK ²⁸¹	26	7.203.753	2
					²⁷⁰ YITPDELANLYK ²⁸¹	41	7.203.756	2
					³⁴⁴ VNQIGSVTESLQACK ³⁵⁸	40	8.174.199	2
					⁴¹³ IEEELGSK ⁴²⁰	34	4.527.336	2
malate dehydrogenase, cytoplasmic isoform MDH1	34.63/6.83	77736203	115	13	¹²⁶ VIVVGNPANTNCLTASK ¹⁴²	14	8.794.656	2
Spot 91					²²¹ GEFITTVQQR ²³⁰	15	5.898.126	2
					²⁴⁹ AICDHVR ²⁵⁵	19	4.357.123	2
					²⁹⁹ VVEGLPINDFSR ³¹⁰	44	6.733.592	2
					²⁹⁹ VVEGLPINDFSR ³¹⁰	47	6.733.661	2
Spot 93	31.71/6.56	77736203	79	6	²²¹ GEFITTVQQR ²³⁰	47	5.898.114	2
					²⁹⁹ VVEGLPINDFSR ³¹⁰	32	6.733.613	2
aldose 1-epimerase	34.63/6.83	77736588	73	5	²² FQLQSDQLR ³⁰	33	5.677.972	2
Spot 91					¹²² VLSNGVEFSR ¹³¹	40	5.542.952	2
Spot 93	31.71/6.56	594095948	122	11	²² FQLQSDQLR ³⁰	32	5.677.997	2

					⁵² ASDVVLGFDKLEGYLQK ⁶⁸	15	6.279.993	3
					¹³² VSPDGEEGYPGELK ¹⁴⁵	75	7.388.496	2
cysteine-rich secretory protein 1 precursor	29.27/6.10	329664664	172	17	⁵⁴ GVSPPASNMLK ⁶⁴	43	5.587.922	2
Spot 94					⁸¹ DCELVQSNALK ⁹¹	39	6.388.157	2
					²²⁵ LGCNHLSVQR ²³⁴	57	3.952.004	3
Spot 95	29.94/5.63	329664664	64	8	²³⁸ ASCMCQTEIK ²⁴⁷	33	6.222.617	2
					⁵⁴ GVSPPASNMLK ⁶⁴	19	5.587.931	2
					²²⁵ LGCNHLSVQR ²³⁴	45	3.952.022	3
extra-cellular superoxide dismutase [CuZn] precursor	28.59/7.91	129277510	368	34	³⁹ VTEIWQEMMQR ⁴⁹	14	7.418.377	2
Spot 99					⁵⁰ QAAAIDPDAALHAVCR ⁶⁵	66	5.602.771	3
					⁶⁶ VLPSATLEAEQPR ⁷⁸	65	7.058.815	2
					⁶⁶ VLPSATLEAEQPR ⁷⁸	119	7.058.828	2
					¹⁶² SGLAASLTGPHSIAGR ¹⁷⁷	83	4.989.333	3
					¹⁶² SGLAASLTGPHSIAGR ¹⁷⁷	78	7.479.066	2
					¹⁷⁸ AVVVHAGEDDMGR ¹⁹⁰	41	4.578.758	3
					¹⁷⁸ AVVVHAGEDDMGR ¹⁹⁰	22	6.863.193	2
Spot 155	29.41/7.65	129277510	195	16	¹⁹¹ GGNQASLENGNAGR ²⁰⁴	64	6.728.165	2
					⁶⁶ VLPSATLEAEQPR ⁷⁸	102	7.058.818	2
					¹⁷⁸ AVVVHAGEDDMGR ¹⁹⁰	41	4.578.766	3
Spot 165	28.59/7.91	129277510	331	29	¹⁹¹ GGNQASLENGNAGR ²⁰⁴	52	6.728.160	2
					⁵⁰ QAAAIDPDAALHAVCR ⁶⁵	27	5.603.007	3
					⁶⁶ VLPSATLEAEQPR ⁷⁸	82	7.058.806	2
					⁶⁶ VLPSATLEAEQPR ⁷⁸	119	7.058.846	2
					¹⁶² SGLAASLTGPHSIAGR ¹⁷⁷	83	4.989.325	3
					¹⁶² SGLAASLTGPHSIAGR ¹⁷⁷	98	7.479.045	2
					¹⁷⁸ AVVVHAGEDDMGR ¹⁹⁰	41	4.578.763	3
Spot 166	29.41/7.65	129277510	375	36	¹⁹¹ GGNQASLENGNAGR ²⁰⁴	46	6.728.145	2
					⁵⁰ QAAAIDPDAALHAVCR ⁶⁵	65	5.602.778	3
					⁶⁶ VLPSATLEAEQPR ⁷⁸	98	7.058.828	2
					¹⁶² SGLAASLTGPHSIAGR ¹⁷⁷	96	4.989.338	3
					¹⁶² SGLAASLTGPHSIAGR ¹⁷⁷	54	7.479.042	2

					¹⁷⁸ AVVVHAGEDDMGR ¹⁹⁰	42	4.578.765	3
					¹⁷⁸ AVVVHAGEDDMGR ¹⁹⁰	18	6.863.222	2
					¹⁹¹ GGNQASLENGNAGR ²⁰⁴	30	6.728.157	2
					²⁰⁶ LACCVVGLCGPGPWAR ²²¹	44	8.869.274	2
					²⁰⁶ LACCVVGLCGPGPWAR ²²¹	10	8.869.279	2
superoxide dismutase	13.13/6.84	2660692	191	23	⁷⁹ HVGDGLGNVTADK ⁹⁰	77	6.133.102	2
Spot 132					¹¹⁵ TMVVHEKPDDLGR ¹²⁷	55	4.995.839	3
					¹¹⁵ TMVVHEKPDDLGR ¹²⁷	81	5.049.144	3
					¹⁴³ LACGVIGIAQ ¹⁵²	32	5.012.919	2
					¹⁴³ LACGVIGIAQ ¹⁵²	13	5.012.928	2
RecName: Full=Sorbitol dehydrogenase	35.17/7.98	118625	148	17	²⁰ LENYPIPEPGPNEVLLK ³⁶	8	9.615.190	2
Spot 100					¹³² HNANFCYK ¹³⁹	8	5.272.319	2
					¹⁹¹ AMGAAQVVVTDLASAR ²⁰⁶	32	7.964.122	2
					³¹² SVNVKPLVTHR ³²²	68	4.172.420	3
					³²⁸ ALEAFETSK ³³⁶	32	4.982.538	2
phosphoglycerate kinase 2	40.31/8.88	174840786	125	10	¹⁵⁷ LGDVYVNDAFGTAHR ¹⁷¹	81	5.455.959	3
Spot 102					¹⁷² AHSSMVGVNLPQK ¹⁸⁴	3	4.619.027	3
					³²⁴ YADVVR ³³⁰	27	3.902.034	2
					³⁵⁴ ALMDEVVK ³⁶¹	14	4.607.400	2
fructose-1,6-bisphosphatase 1	33.98/8.42	985567354	439	33	¹⁷ FVMEEGR ²³	31	4.422.020	2
Spot 103					⁴⁴ AISTAVR ⁵⁰	22	3.592.143	2
					¹⁰² HAIIVEPEKR ¹¹¹	36	3.978.954	3
					²⁰⁷ GSYSLNEGYAK ²¹⁸	68	6.513.203	2
					²⁰⁷ GSYSLNEGYAK ²¹⁸	63	6.513.221	2
					²¹⁹ DFDPALTEYVQR ²³⁰	88	7.273.502	2
					²¹⁹ DFDPALTEYVQR ²³⁰	38	7.273.503	2
					²³³ FPPDNSAPYGAR ²⁴⁴	53	6.463.086	2
					²⁴⁵ YVGSMAVADVHR ²⁵⁵	38	4.172.017	3
					²⁴⁵ YVGSMAVADVHR ²⁵⁵	46	6.253.032	2
					²⁵⁶ TLVYGGIFMYPANK ²⁶⁹	15	7.874.111	2
					²⁵⁶ TLVYGGIFMYPANK ²⁶⁹	21	7.954.073	2

					²⁵⁶ TLVYGGIFMYPANK ²⁶⁹	41	7.954.107	2
					²⁷⁸ LLYECNPMAYVIEK ²⁹¹	29	8.799.255	2
					³⁰¹ ETVLDIVPTDIHQK ³¹⁴	16	5.366.225	3
					³⁰¹ ETVLDIVPTDIHQK ³¹⁴	25	8.044.338	2
beta-2-microglobulin	10.91/8.72	594201576	164	19	⁶⁶ IKSEQSDLSFSK ⁷⁷	47	4.568.980	3
Spot 119					⁶⁶ IKSEQSDLSFSK ⁷⁷	80	6.848.508	2
					⁶⁸ SEQSDLSFSK ⁷⁷	50	5.642.609	2
					¹⁰³ HVTLEQPQIVK ¹¹³	34	6.463.702	2
Spot 120	10.90/8.30	594201576	99	19	⁶⁶ IKSEQSDLSFSK ⁷⁷	41	4.568.964	3
					⁶⁸ SEQSDLSFSK ⁷⁷	50	5.642.595	2
					¹⁰³ HVTLEQPQIVK ¹¹³	8	6.463.669	2
uncharacterized protein LOC102414936 precursor	12.56/7.73	595763495	322	56	³² KLGLDGYK ³⁹	34	4.472.529	2
Spot 124					³³ LGLDGYK ³⁹	34	3.832.013	2
					⁴⁰ GVSLANWLCCLK ⁵¹	54	6.813.604	2
					⁶⁰ ATNYPSSSESTDYGFQINSK ⁸⁰	19	11.685.295	2
					⁶⁰ ATNYPSSSESTDYGFQINSK ⁸⁰	47	11.685.377	2
					⁸¹ WWCNDGK ⁸⁷	29	4.831.986	2
					⁸⁸ TPNAVDGCHVSCSELMENDIAK ¹⁰⁹	40	8.163.558	3
					⁸⁸ TPNAVDGCHVSCSELMENDIAK ¹⁰⁹	46	8.216.837	3
					¹³⁵ DHDVSSYIEGCTL ¹⁴⁷	79	7.483.206	2
PREDICTED: epididymal secretory protein E1	13.80/8.52	594059606	401	52	²⁴ FKDCGSWVGVIK ³⁵	57	6.983.566	2
Spot 125					²⁶ DCGSWVGVIK ³⁵	34	5.607.723	2
					³⁶ EVNVSPCPTQPCK ⁴⁸	15	7.583.427	2
					³⁶ EVNVSPCPTQPCK ⁴⁸	37	7.583.466	2
					⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	42	8.070.833	3
					⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	45	8.124.136	3
					⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	72	8.124.155	3
					⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	32	8.124.173	3
					¹⁰⁴ DKTYNYVVK ¹¹²	36	5.727.807	2
					¹⁰⁶ TYNYVVK ¹¹²	20	4.512.178	2
					¹¹⁷ SEYPSIK ¹²³	12	4.122.067	2

						¹²⁴ VVVEWELTDDK ¹³⁴	64	6.668.340	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	40	5.776.211	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	52	5.776.222	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	60	5.776.226	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	70	8.659.378	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	62	8.659.379	2
Spot 126	14.83/8.52	594059606	484	60		²⁴ FKDCGSWVGVIK ³⁵	34	4.658.990	3
						²⁴ FKDCGSWVGVIK ³⁵	65	6.983.541	2
						²⁴ FKDCGSWVGVIK ³⁵	80	6.983.552	2
						²⁶ DCGSWVGVIK ³⁵	35	5.607.600	2
						³⁶ EVNVSPCPTQPCK ⁴⁸	41	7.583.456	2
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	71	8.070.809	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	32	12.101.355	2
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	64	8.123.980	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	72	8.124.150	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	51	12.181.261	2
						¹⁰⁴ DKTYNYVNK ¹¹²	45	5.727.814	2
						¹⁰⁶ TYNYVNK ¹¹²	35	4.512.201	2
						¹¹⁷ SEYPSIK ¹²³	15	4.121.898	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDK ¹³⁴	89	6.668.362	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	58	5.776.170	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	56	5.776.212	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	65	5.776.215	3
						¹³⁸ FFCWQIPIEVEA ¹⁴⁹	6	7.698.719	2
Spot 128	15.37/8.00	594059606	417	52		²⁴ FKDCGSWVGVIK ³⁵	80	6.983.566	2
						²⁶ DCGSWVGVIK ³⁵	34	5.607.634	2
						²⁶ DCGSWVGVIK ³⁵	32	5.607.634	2
						³⁶ EVNVSPCPTQPCK ⁴⁸	35	7.583.144	2
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	63	8.070.799	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	65	8.070.822	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	68	8.123.993	3

						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	64	8.124.042	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	64	12.181.257	2
						¹⁰⁴ DKTYNYVNK ¹¹²	45	5.727.732	2
						¹⁰⁶ TYNYVNK ¹¹²	35	4.511.995	2
						¹¹⁷ SEYPSIK ¹²³	15	4.121.871	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	53	5.776.074	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	69	5.776.219	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	104	8.659.325	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	56	8.659.344	2
Spot 129	14.60/7.30	594059606	416	55		²⁴ FKDCGSWVGVIK ³⁵	87	6.983.540	2
						²⁴ FKDCGSWVGVIK ³⁵	46	6.983.557	2
						²⁶ DCGSWVGVIK ³⁵	31	5.607.675	2
						²⁶ DCGSWVGVIK ³⁵	42	5.607.699	2
						³⁶ EVNVSPCPTQPCK ⁴⁸	34	7.583.353	2
						³⁶ EVNVSPCPTQPCK ⁴⁸	10	7.583.441	2
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	56	8.070.838	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	60	8.124.101	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	79	8.124.167	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	76	8.124.167	3
						⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	48	12.181.282	2
						¹⁰⁴ DKTYNYVNK ¹¹²	47	5.727.843	2
						¹⁰⁶ TYNYVNK ¹¹²	12	4.512.136	2
						¹⁰⁶ TYNYVNKLPVK ¹¹⁶	5	4.469.173	3
						¹¹⁷ SEYPSIK ¹²³	12	4.122.016	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDK ¹³⁴	34	6.668.339	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	64	5.776.214	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	52	5.776.224	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	48	5.776.224	3
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	45	8.659.350	2
						¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	27	8.659.385	2
Spot 135	14.69/6.00	27806881	121	24		⁷² AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁹⁴	53	8.070.841	3

					⁷² AVVHGIVMGIPVFPPIESDGCK ⁹⁴	49	8.124.146	3
					¹²⁴ VVVEWELTDDKNQR ¹³⁷	68	5.776.215	3
PREDICTED: peroxiredoxin-5, mitochondrial	14.04/6.53	555964155	245	35	⁶³ VGDAIPSVVEVFEK ⁷⁵	22	6.953.647	2
Spot 131					⁶³ VGDAIPSVVEVFEKEPGNK ⁸⁰	19	6.389.925	3
					⁸¹ VNLAELFK ⁸⁸	38	4.672.699	2
					⁹² GVLFGPLGAFTPGCSK ¹⁰⁷	14	8.044.149	2
					⁹² GVLFGPLGAFTPGCSK ¹⁰⁷	29	8.044.181	2
					¹⁰⁸ THLPGFVEQADALK ¹²¹	50	5.092.650	3
					¹⁰⁸ THLPGFVEQADALK ¹²¹	8	7.634.047	2
					¹⁵⁴ LLADPNGTFGK ¹⁶⁴	40	5.668.002	2
					¹⁸⁶ FSMVIEDGIVK ¹⁹⁶	12	6.193.264	2
					¹⁸⁶ FSMVIEDGIVK ¹⁹⁶	46	6.273.255	2
PREDICTED: epididymal-specific lipocalin-5-like	17.79/7.60	594077881	282	37	⁵⁶ KVGAVIVEQDGPLSLTSVSDHMNLCKM ⁸³	22	7.751.253	4
Spot 144					⁵⁷ KVGAVIVEQDGPLSLTSVSDHMNLCKM ⁸³	23	7.431.017	4
					⁹⁹ IPLQSGGK ¹⁰⁶	41	4.002.235	2
					⁹⁹ IPLQSGGK ¹⁰⁶	45	4.002.289	2
					¹⁰⁷ EVIVVATDYK ¹⁰⁶	64	5.688.027	2
					¹⁰⁷ EVIVVATDYK ¹¹⁶	63	5.688.072	2
					¹⁰⁷ EVIVVATDYK ¹¹⁶	65	5.688.123	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	64	6.613.569	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	62	6.613.634	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	65	6.693.506	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	58	6.693.583	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	56	6.693.625	2
					¹⁴¹ TLEHNEEATEK ¹⁵¹	62	6.508.015	2
Spot 145	17.81/8.05	594077881	295	38	⁵⁶ KVGAVIVEQDGPLSLTSVSDHMNLCKM ⁸³	7	7.751.267	4
					⁵⁷ KVGAVIVEQDGPLSLTSVSDHMNLCKM ⁸³	13	7.431.006	4
					⁹⁷ FKIPLQSGGK ¹⁰⁶	33	3.588.739	3
					⁹⁹ IPLQSGGK ¹⁰⁶	46	4.002.284	2
					¹⁰⁷ EVIVVATDYK ¹¹⁶	64	5.688.109	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	62	6.613.637	2

					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	66	6.693.521	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	53	6.693.593	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	58	6.693.632	2
					¹⁴¹ TLEHNEEATEK ¹⁵¹	40	4.341.938	3
					¹⁴¹ TLEHNEEATEK ¹⁵¹	66	6.507.988	2
Spot 146	17.85/8.50	594077881	121	17	⁹⁷ FKIPLQSGGK ¹⁰⁶	20	5.378.154	2
					¹⁰⁷ EVIVVATDYK ¹¹⁶	64	5.688.110	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	36	6.613.638	2
Spot 152	18.00/7.04	594077881	266	28	⁹⁷ FKIPLQSGGK ¹⁰⁶	25	3.588.753	3
					⁹⁷ FKIPLQSGGK ¹⁰⁶	40	5.378.151	2
					⁹⁹ IPLQSGGK ¹⁰⁶	38	4.002.320	2
					¹¹⁷ EVIVVATDYK ¹¹⁶	63	5.688.110	2
					¹¹⁷ EVIVVATDYK ¹¹⁶	64	5.688.124	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	57	6.613.635	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	53	6.613.677	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	60	6.693.602	2
					¹¹⁷ TYAIMNIIILNR ¹²⁷	60	6.693.637	2
					¹²⁸ GGKPSSVLK ¹³⁶	13	4.367.612	2
					¹⁴¹ TLEHNEEATEK ¹⁵¹	50	4.341.994	3
PREDICTED: epididymal secretory glutathione peroxidase	20.90/8.37	594086871	301	35	³⁶ GTIYDYDAFTLNGK ⁴⁹	82	7.893.794	2
Spot 147					¹⁰⁵ QEPGENSEILPGLK ¹¹⁸	61	7.558.912	2
					¹¹⁹ YVRPGGGYVPNFQLFEK ¹³⁵	16	6.576.697	3
					¹¹⁹ YVRPGGGYVPNFQLFEK ¹³⁵	26	6.576.697	3
					¹⁶⁶ HISWEPIMVHDIR ¹⁷⁸	47	5.502.743	3
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	46	6.438.474	2
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	40	6.518.461	2
					²⁰⁷ SDILAYMK ²¹⁴	26	4.707.409	2
					²⁰⁷ SDILAYMK ²¹⁴	40	4.787.404	2
Spot 148	20.85/8.12	594086871	280	35	³⁶ GTIYDYDAFTLNGK ⁴⁹	46	7.893.759	2
					¹⁰⁵ QEPGENSEILPGLK ¹¹⁸	76	7.558.937	2
					¹¹⁹ YVRPGGGYVPNFQLFEK ¹³⁵	24	6.576.678	3

					¹¹⁹ YVRPGGGYVPNFQLFEK ¹³⁵	11	9.860.110	2
					¹⁶⁶ HISWEPIMVHDIR ¹⁷⁸	48	5.502.735	3
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	46	6.438.447	2
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	35	6.518.433	2
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	43	6.518.467	2
					²⁰⁷ SDILAYMK ²¹⁴	27	4.707.409	2
					²⁰⁷ SDILAYMK ²¹⁴	39	4.787.391	2
Spot 149	20.83/7.74	594086871	244	35	³⁶ GTIYDYDAFTLNGK ⁴⁹	56	7.893.751	2
					¹⁰⁵ QEPGENSEILPGLK ¹¹⁸	50	7.558.906	2
					¹⁰⁵ QEPGENSEILPGLK ¹¹⁸	40	7.558.942	2
					¹¹⁹ YVRPGGGYVPNFQLFEK ¹³⁵	20	6.576.683	3
					¹¹⁹ YVRPGGGYVPNFQLFEK ¹³⁵	26	6.576.691	3
					¹⁶⁶ HISWEPIMVHDIR ¹⁷⁸	46	5.502.741	3
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	48	6.438.472	2
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	41	6.438.489	2
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	27	6.518.442	2
					²⁰⁷ SDILAYMK ²¹⁴	18	4.787.411	2
Spot 150	20.90/7.48	594086871	85	19	¹¹⁹ YVRPGGGYVPNFQLFEK ¹³⁵	17	6.576.678	3
					¹⁶⁶ HISWEPIMVHDIR ¹⁷⁸	15	5.502.734	3
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	53	6.438.486	2
					¹⁸⁴ FLVGPDPGVPVMR ¹⁹⁵	28	6.518.471	2
PREDICTED: phosphatidylethanolamine-binding-protein 4	21.91/6.55	594032479	91	15	⁷⁰ ITTWPEPIVK ⁷⁹	33	5.923.358	2
Spot 151					¹³² LSPYQPPSPPAHSGLHR ¹⁴⁸	48	6.143.174	3
					¹⁶⁰ TISLSPK ¹⁶⁶	10	3.732.229	2
sperm acrosome membrane-associated protein 3 precursor	11.73/5.48	157279923	70	6	⁴⁶ VLQDFGLEGYR ⁵⁶	57	6.488.287	2
Spot 153					⁴⁶ VLQDFGLEGYR ⁵⁶	70	6.488.314	2
PREDICTED: C-reactive protein	22.74/7.29	594074562	138	16	³³ ETENSYSVLK ⁴²	47	5.852.867	2
Spot 163					⁶⁷ SYSIFSATK ⁷⁶	45	5.837.880	2
					⁹¹ GYIFGVR ⁹⁷	22	4.062.256	2
PREDICTED: prostaglandin-H2 D-isomerase	22.74/7.29	594077764	135	14	²¹⁵ GEVFIKQLW ²²⁴	24	6.088.375	2

Spot 163					¹³⁸ GPGQDFR ¹⁴⁴	36	3.886.847	2
					¹⁴⁵ MATLYSR ¹⁵¹	45	4.292.122	2
					¹⁶⁹ SLGFTEEGIMFLPK ¹⁸²	54	7.929.006	2
glutathione S-transferase Mu 3	23.55/6.86	114053087	120	21	⁶ SMVLGYWDIR ¹⁵	18	6.283.085	2
Spot 164					¹⁶ GLAHAIR ²²	29	3.692.222	2
					²³ MLEFTDTSYEEK ³⁵	33	8.033.778	2
					³⁷ YTCGEAPDYDK ⁴⁷	34	6.597.654	2
					¹⁴⁹ YSWFAGEK ¹⁵⁶	7	4.942.296	2
PREDICTED: beta-hexosaminidase subunit beta-like	60.43/7.52	594035743	196	17	⁷⁹ AGPSCAVLQEAFR ⁹¹	104	7.033.474	2
Spot 167					⁷⁹ AGPSCAVLQEAFR ⁹¹	96	7.033.502	2
					¹⁰³ WPLGSDNVPR ¹¹²	37	5.707.907	2
					¹⁴⁷ GPVATLTANR ¹⁵⁶	55	5.002.748	2
PREDICTED: beta-hexosaminidase subunit beta	60.03/7.73	594062845	115	8	²⁴ GPVATLTANR ³³	55	5.002.748	2
Spot 167					⁹¹ TLDAMAFNK ⁹⁹	9	5.057.510	2
					⁹¹ TLDAMAFNK ⁹⁹	11	5.137.492	2
					¹⁴² TVIEYAR ¹⁴⁸	23	4.262.276	2
					²³² SNAAVLHFMR ²⁴¹	25	5.733.007	2
hypoxia-associated protein	39.97/7.05	1245926	48	100	¹ YITPDELANLYK ¹²	48	7.203.724	2
Spot 169								