

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal

**Proteoma do plasma seminal de touros da raça
Gir – Leiteiro (*Bos taurus indicus*) clinicamente
normais e com hipoplasia testicular**

Cíntia Libéria Faria Santos

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2015

Cíntia Libéria Faria Santos

**Proteoma do plasma seminal de touros da raça Gir – Leiteiro
(*Bos taurus indicus*) clinicamente normais e com hipoplasia
testicular**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como pré –
requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal.

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho
Co-orientador: Jorge André Matias Martins

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2015

S237p Santos, Cíntia Libéria Faria, 1986-
Proteoma do plasma seminal de touros da raça Gir – Leiteiro (*Bos taurus indicus*)
clínicamente normais e com hipoplasia testicular / Cíntia Libéria Faria Santos. – 2015.
64 p. : il.

Orientador: Vicente Ribeiro do Vale Filho

Co-orientador: Jorge André Matias Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Testículos – Doenças – Teses. 3. Sêmen –
Análise – Teses. 4. Eletroforese – Teses. I. Vale Filho, Vicente Ribeiro do. II. Martins,
Jorge André Matias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
IV. Título.

CDD – 636.214 089 69

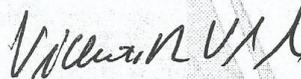


FOLHA DE APROVAÇÃO

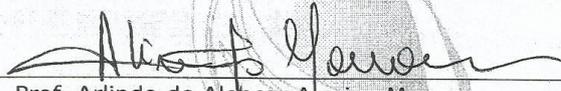
CÍNTIA LIBÉRIA FARIA SANTOS

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

Aprovada em 13 de março de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho
Presidente - Orientador



Prof. Arlindo de Alencar Araújo Moura
Universidade Federal do Ceará



Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
Escola de Veterinária-UFMG



Aos meus pais, meu irmão e Renan,
pelo amor, carinho, incentivo e apoio.

Dedico.

“Se você pode sonhar, você pode realizar.”

Walt Disney

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, por sempre guiar meus passos e me proteger.

À minha amada família pelo carinho, cuidado, apoio e incentivo. Tudo só foi possível porque tenho vocês ao meu lado.

Ao Renan, meu amor, pelo carinho, companheirismo, apoio e compreensão.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e à Escola de Veterinária (EV-UFMG) pela oportunidade de concluir meus estudos e me tornar Médica Veterinária.

Ao Programa de pós – graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realizar uma das etapas deste trabalho.

Ao Professor Vicente Ribeiro do Vale Filho, pela oportunidade, ainda na graduação, de realizar a iniciação científica sob sua coordenação. Também pela amizade, ensinamentos e orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura, pela oportunidade de trabalhar com sua equipe no Laboratório de Fisiologia Animal do departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC) durante a realização da análise proteica do sêmen dos animais do experimento. Pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Ao Professor Marc Roger Jean Marie Henry pela participação na banca examinadora e pela contribuição com suas sugestões.

Ao Professor Jorge André Matias Martins por ter aceitado ser o co-orientador da nossa pesquisa, por ter me recebido tão bem na Universidade Federal do Ceará (UFC) e me ensinado, com tanta paciência, toda a técnica para realização da análise proteômica. Pela amizade e por sempre estar disponível para discutirmos os resultados e tirar todas as minhas dúvidas. Serei eternamente grata.

A todos os professores da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais responsáveis pela minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos proprietários e funcionários das fazendas colaboradoras por cederem os animais e pela ajuda na execução dos trabalhos.

Aos amigos da reprodução, Ticiano, Lucas, Gilson e, em especial, ao Guilherme pela oportunidade de trabalhar nesta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ronaldo, Paula, Verônica, Révila, e Taciane pela amizade e ajuda na realização de todas as etapas da análise proteômica.

À Dona Rosimar e sua filha Cláudia por terem me hospedado em sua casa e me tratado com tanto carinho durante os três meses que morei em Fortaleza - CE para realização de uma parte deste trabalho.

Às minhas “Bests da Vet”, amigas tão queridas que tive o prazer de conhecer durante a graduação e que levarei por toda a vida. Tenho um carinho enorme por vocês e agradeço pela amizade de sempre.

Às queridas amigas da veterinária, Lelê, Mandinha, Clara, Flavinha e Karol, por terem me acolhido de coração aberto e construído uma amizade linda.

Às amigas de Abaeté, Fabiana, Laís, Thaís, Luciana e Veri pela amizade e compreensão nos momentos de ausência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVOS.....	12
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1	A RAÇA GIR – LEITEIRO.....	12
3.2	HIPOPLASIA TESTICULAR.....	13
3.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REPRODUTIVO DE TOUROS.....	15
3.4	PLASMA SEMINAL.....	16
3.5	PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL.....	16
3.6	ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE).....	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	PROPRIEDADES.....	19
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	20
4.3	EXAME ANDROLÓGICO.....	21
4.4	AVALIAÇÃO PROTEICA DO SÊMEN.....	22
4.4.1	Preparação das amostras e quantificação proteica.....	23
4.4.2	Eletroforese bi-dimensional (2-DE)	23
4.4.3	Análise das imagens e Resultados.....	25
4.4.4	Identificação das proteínas - (ESI/QUAD-ToF)	25
4.4.4.1	Digestão das proteínas.....	26
4.4.4.1.1	Espectrometria de Massa.....	26
4.4.5	Ontologia gênica.....	26
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA – ANDROLÓGICA.....	27
5.2	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL.....	33
6.	CONCLUSÃO.....	41
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
8.	ANEXOS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mensuração da circunferência escrotal	22
Figura 2	Mensuração individual do comprimento de cada testículo	22
Figura 3	Protocolo de focalização	24
Figura 4	Gel digitalizado	25
Figura 5	Média de idade (barras cinzas) e peso corporal (barras pretas) entre animais Gir – L hipoplásicos e normais	28
Figura 6	A: Média de circunferência escrotal entre touros Gir – L hipoplásicos e normais. B: Média de comprimento, largura e volume dos testículos direito e esquerdo de touros Gir – L normais e hipoplásicos. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de pareado.	30
Figura 7	A: Médias de concentração espermática (barras cinzas) e volume ejaculado (barras pretas) de touros Gir – L hipoplásicos e normais. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste t de Student. B: Média do percentual de espermatozoides móveis (barras hachuradas), turbilhão espermático (barras pretas) e de vigor espermático (barras cinzas) de touros Gir – L hipoplásicos e normais. O asterisco (*) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste t de Student. C: Médias de defeitos maiores (barras pretas), defeitos menores (barras cinza claro) e defeitos espermáticos totais (barras cinza escuro). Os asteriscos simples (*), duplo (**) e triplo (***) indicam diferenças significativas pelo teste t de Student a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente.	31
Figura 8	Morfologia espermática de um animal normal e três hipoplásicos; 1: animal clinicamente normal; 2: sêmen apresentando defeitos de peça intermediária e <i>pouch formation</i> ; 3: espermatozoides com cabeça piriforme; 4: espermatozoides apresentando gota citoplasmática proximal	33
Figura 9	Gel “master” de proteínas do plasma seminal de touros Gir – Leiteiro adultos. O gel foi obtido a partir de um “match set” com géis do plasma seminal de touros normais (n=9) e hipoplásicos (n=9). As proteínas anotadas referem-se àquelas com maior expressão nos animais hipoplásicos	34
Figura 10	Biological process anotations for gene ontology of diferentially expressed seminal plasma proteins of Gyr bulls	40
Figura 11	Molecular function anotations for gene ontology of diferentially expressed seminal plasma proteins of Gyr bulls	40

RESUMO

A raça Gir – Leiteiro é uma excelente opção para os rebanhos leiteiros no Brasil pelas características apresentadas por seus animais, como rusticidade, adaptabilidade e produção de leite expressiva. A hipoplasia testicular causa problemas reprodutivos nos touros podendo levar à subfertilidade ou, em casos mais graves, à infertilidade. No Brasil, a incidência dessa patologia varia de 5 a 15%. Devido à grande importância que animais da raça Gir – Leiteiro têm na pecuária brasileira e aos impactos negativo, tanto em termos de fertilidade quanto economicamente, causados pela hipoplasia testicular, este trabalho objetivou traçar o perfil proteico diferencialmente expresso entre animais com esta patologia e clinicamente normais. Amostras de sêmen de 18 animais (9 hipoplásicos e 9 normais) foram coletadas e o plasma seminal foi centrifugado e submetido à eletroforese bidimensional (2-DE). Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250, digitalizados e analisados pelo programa PDQuest™ 2-D Analysis Software para identificação dos “spots”. Foram identificados 33 “spots” diferencialmente expressos entre os dois grupos de animais, sendo 26 mais intensamente expressos em animais hipoplásicos. Os “spots” foram cortados dos géis e submetidos à espectrometria de massa sendo identificadas 38 proteínas e, dentre estas, o grupo de proteínas conhecidas como *Binder of Sperm Proteins* (BSP) e a *platelet-activating fator acetylhydrolase* (PAF – AH) foram as mais presentes nos “spots” identificados nos animais hipoplásicos. Os animais também foram submetidos à avaliação clínico-andrológica e houve diferenças estatísticas quanto ao comprimento, largura e volume testicular, turbilhonamento e defeitos espermáticos ($p < 0,05$).

Palavras Chave: hipoplasia testicular, proteínas do plasma seminal, Gir – Leiteiro.

ABSTRACT

*The Gir - Dairy is an excellent option for dairy herds in Brazil because of the features presented by its animals, such as hardiness, adaptability and expressive milk production. Testicular hypoplasia causes reproductive problems in bulls and can lead to subfertility or, in more severe cases, infertility. In Brazil, the incidence of this disease varies from 5 to 15%. Due to the great importance that Gyr- Dairy animals have in the Brazilian cattle industry and because of the negative impact, not only in economically terms but also in fertility, caused by testicular hypoplasia, this study aimed to determine the differentially expressed protein profile between animals with this disease and clinically normal. Semen samples from 18 animals (9 hypoplastic and 9 normal) were collected and seminal plasma was centrifuged and subjected to two-dimensional electrophoresis (2-DE). Gels were stained with Coomassie Blue G-250, digitized and analyzed using PDQuest™ program 2-D Analysis Software to identify the "spots". Were identified 33 "spots" differentially expressed between the two groups of animals, 26 more intensely expressed in hypoplastic animals. The "spots" were cut from the gels and subjected to mass spectrometry and identified 38 proteins and, among these, the group of proteins known as *Binder of Sperm Proteins* (BSP) and *platelet-activating factor acetylhydrolase* (PAF - AH) were more present in spots identified in hypoplastic animals. The animals also underwent clinical and soundness evaluation and were statistical differences in the length, width and testicular volume, turbulence and sperm defects ($p < 0.05$).*

Keywords: testicular hypoplasia, seminal plasma proteins, Gir – Dairy.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo com mais de 200 milhões de cabeças de gado e é o país que mais exporta carne bovina. Com relação à produção de leite, segundo o IBGE, em 2013 a produção no Brasil aumentou 6 % e o Sudeste foi responsável por cerca de 35% de toda a produção.

A raça Gir – Leiteiro tem se mostrado como excelente opção para os rebanhos leiteiros no Brasil, principalmente nos cruzamentos com a raça Holandês, gerando animais extremamente rústicos, com boa conversão alimentar e alta produção leiteira (ACGZ, 2014).

A lucratividade de um rebanho depende do bom desempenho de seus animais e de seleções daqueles geneticamente superiores quanto a características ligadas à fertilidade e produtividade. A seleção de reprodutores baseada em características produtivas, sendo os selecionados aqueles que produzem filhas com maiores produções de leite, muitas vezes deixa de selecionar animais com maiores fertilidades contribuindo, muitas vezes, para um desempenho menos eficiente do rebanho (VALE FILHO et al., 1979).

A fertilidade dos touros é influenciada por vários fatores que podem ser de origem genética, congênita ou adquirida (BICUDO, et al., 2007). A hipoplasia testicular é uma patologia de característica hereditária, reduz a eficiência do epitélio germinativo dos testículos e leva a falhas reprodutivas e desempenho insatisfatório dos reprodutores. No Brasil, tem sido descrita por apresentar incidências que variam de 5% (VALE FILHO et al.; 1979) a 15% (GOIOZO, 2003).

Uma das etapas mais importantes nos rebanhos que utilizam a monta natural é a seleção de machos a serem utilizados como futuros reprodutores, principalmente ao se considerar que o touro transmite 50% do seu genótipo a um grande número de filhos (QUIRINO, 1999). Além disso, com o uso da inseminação artificial um único touro gera doses de sêmen suficientes para serem utilizadas em grande número de vacas, sendo responsável por significativa parte do ganho genético dos animais. Para intensificar a função reprodutiva, tanto na monta natural quanto na inseminação artificial, os touros devem produzir um grande número de espermatozoides morfolologicamente normais e férteis (KASTELIC, 2014).

Na avaliação do potencial reprodutivo de touros as ferramentas mais comumente utilizadas são o exame andrológico e a Classificação Andrológica por Pontos (CAP). Entretanto, apenas o exame andrológico e alta pontuação na CAP podem não serem suficientes para predizer sua fertilidade quanto à criopreservação do sêmen e outros aspectos biotécnicos. Diante disso, o uso de ferramentas adicionais de avaliação, como as proteínas do plasma seminal e concentração sérica de testosterona tornam-se importantes. A avaliação do perfil proteico do plasma seminal pode auxiliar na elucidação dos processos fisiopatológicos que acometem reprodutores e poderão atuar como possíveis marcadores bioquímicos para a fertilidade (WELTER, 2006).

A análise proteica do sêmen constitui uma ferramenta viável para o estudo das potenciais funções das proteínas, buscando-se marcadores proteicos de fenótipos específicos e/ou processos fisiológicos (BARROS et al, 2013). Muitas pesquisas feitas com as proteínas do plasma seminal tem indicado que algumas estão relacionadas com a fertilidade (KUMAR et al, 2012).

2. OBJETIVO

Avaliar o perfil proteico do plasma seminal de touros Gir – Leiteiro com e sem a manifestação clínica de hipoplasia testicular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A RAÇA GIR – LEITEIRO

O Gir Leiteiro é uma raça zebuína originária da Índia, das regiões de Gir da Península de Kathiawar. Os primeiros exemplares de Gir foram introduzidos no Brasil por volta de 1906 e mais quatro importações realizadas nos anos de 1930, 1955, 1960 e 1962 foram extremamente importantes para a formação do Gir brasileiro. Na década de 30, alguns criadores identificaram em diferentes planteis exemplares de Gir que se destacavam por sua capacidade leiteira. O Gir leiteiro é resultado da seleção efetuada por algumas entidades governamentais e, principalmente, por criadores particulares de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro que fundamentaram seus trabalhos dando ênfase à seleção para leite. A partir de então, formou-se um biotipo especializado com produções leiteiras aferidas permitindo distinguir-se os animais pelo seu desempenho e nível de produção da sua linhagem (ACGZ, 2014).

O interesse por animais da raça Gir – Leiteiro vem crescendo de forma acelerada nos últimos anos, por ser excelente opção para a pecuária leiteira do Brasil, uma vez que os animais contribuem com alta produtividade, além do vigor, docilidade e rusticidade, principalmente quando cruzados com gado europeu. Atualmente, a raça está distribuída em praticamente todo país e presente em mais de 80% dos rebanhos bovinos leiteiros, constituídos de animais puros e cruzados. A demanda por animais da raça é cada vez maior no mercado interno e, além disso, o mercado externo vem se mostrando como potencial, o que pode ser verificado pelas exportações oficiais de sêmen para as Américas, sendo a raça Gir – Leiteiro correspondente a 80% do total (REIS FILHO, 2006; ABCGIL, 2014). Segundo a ASBIA (2014), no ano de 2013 foram vendidas 684.259 doses de sêmen da raça Gir – Leiteiro, correspondendo a cerca de 43% do total de doses de sêmen das raças de leite comercializadas no Brasil.

O Gir Leiteiro foi selecionado para maiores produções de leite, com produções médias, segundo os controles oficiais, de 3.198 Kg de leite em 305 dias, chegando a produções de até 5000 Kg de leite/lactação já existindo, hoje, lactações oficiais ultrapassando 10.000 Kg/leite (AMCGIL, 2014).

Atualmente, entre os animais zebuínos importados, estima-se que poucos sejam da raça Gir, o que somado a seleção, ainda hoje, praticada intensamente dentro dos próprios rebanhos e o uso de reduzido número de touros provados, leva a uma possibilidade maior do acasalamento de indivíduos aparentados (endogamia). Isto aumenta a homozigose e a frequência de genes deletérios, com conseqüente redução da fertilidade e desempenho fenotípico dos animais (REIS FILHO 2006).

3.2. HIPOPLASIA TESTICULAR

A hipoplasia testicular, uma anomalia do desenvolvimento dos testículos de origem hereditária, acomete todas as espécies domésticas e se caracteriza pela redução de volume dos testículos e, histologicamente, por túbulos seminíferos com diâmetro reduzido ou ausência total de espermatogênese, e presença de células de Sertoli aparentemente normais (SANTOS E ALESSI, 2011). Caracteriza-se pelo incompleto desenvolvimento das camadas germinativas dos túbulos seminíferos, de gravidade variável, observando-se desde uma diminuição da concentração espermática e aumento de gametas defeituosos no sêmen até a azoospermia (NASCIMENTO E SANTOS, 1997). Tem como causa a expressão de um gene recessivo autossômico de penetrância

incompleta interferindo na espermatogênese (VALE FILHO et al., 1979; LOGUE e GREIG, 1986; NASCIMENTO E SANTOS, 1997). De acordo com MOURA (2013), e também relatado por outros autores, a maior incidência da hipoplasia é observada no testículo esquerdo.

A alteração testicular pode ser uni ou bilateral, parcial ou total. A hipoplasia total caracteriza-se pelo envolvimento de todos os túbulos seminíferos, portanto se a lesão for unilateral o animal é subfértil e se for bilateral resulta em esterilidade. Animais com hipoplasia parcial ou unilateral são indesejáveis no rebanho, pois têm capacidade reprodutiva limitada, tendo por conseguinte, capacidade de disseminação de tal patologia entre sua progênie (SANTOS E ALESSI 2011; STEFFEN, 1997 citado por BICUDO, 2007).

Alterações do trato genital do touro, sejam elas de qualquer ordem, podem levar à subfertilidade, infertilidade, ou até à esterilidade. Quando a causa da subfertilidade é de ordem genética, como no caso da hipoplasia testicular, o animal apresenta esta condição de forma permanente. Animais com essa condição apresentam parâmetros clínico – andrológicos incompatíveis com uma boa condição reprodutiva portanto, não recomendados para uso como reprodutores (MOURA, 2013). Este mesmo autor, encontrou maior número de cópias de um gene ligado a subfertilidade (TSPY) em animais hipoplásicos quando comparados com animais normais.

Além disso, o animal subfértil é capaz de gerar descendentes, fator indesejável, pois sendo de causa genética será transmitida a seus descendentes, perpetuando-a nas futuras descendências. Nesses casos, é importante a identificação desses animais através de exames andrológicos em diferentes datas, gerando um diagnóstico e prognóstico seguros a fim de eliminá-los do rebanho (VALE FILHO et al., 1979; BICUDO, 2007).

A hipoplasia testicular tem uma incidência de 5 a 15% nos rebanhos bovinos do Brasil (VALE FILHO, 1988; GOIOZO, 2003). GARCIA (1971) trabalhando com 208 touros normais e com distúrbios reprodutivos, de raças europeias e indianas, encontrou uma prevalência de 3,36% de animais hipoplásicos. Dentre as patologias espermáticas desses animais, a maior prevalência foi a de defeitos de cabeça e gota citoplasmática proximal, 28,16% e 15,40% do total de defeitos, respectivamente. Além disso, estes animais apresentavam-se com baixos valores de concentração espermática, turbilhonamento e motilidade.

3.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REPRODUTIVO DE TOUROS

A avaliação do potencial reprodutivo do touro é feita, principalmente, por meio do exame andrológico. Nesse exame, faz-se mensurações testiculares, avaliações das glândulas vesiculares, vigor, motilidade e morfologia do sêmen, além de avaliações laboratoriais e aferição do peso corporal (SALVADOR et al, 2002; VALE FILHO et al., 1979). A primeira avaliação andrológica deve ser feita, em touros da raça zebu, com um ano de idade, devendo-se dar preferência para animais com circunferência escrotal acima de 26 cm e com espermatozoides com motilidade de 20% (ou pelo menos 5%), para serem utilizados como futuros reprodutores (VALE FILHO et al, 2010).

Um exame clínico geral deve, também, ser feito inspecionando-se o animal quanto à normalidade dos diversos sistemas (respiratório, circulatório, digestivo, nervoso, locomotor), com especial atenção para os aprumos. O animal deverá estar em boa condição física geral, tamanho, peso e conformação normais para a idade e a raça (VALE FILHO et al, 2012).

Além disso, foi proposto por VALE FILHO (1988) um método de avaliação dos reprodutores zebuínos, a CAP (Classificação Andrológica por Pontos), que atribui uma pontuação à medida da circunferência escrotal e as características físicas e morfológicas do sêmen em função da idade, apresentando correlações positivas com a fertilidade. Touros clinicamente normais considerados aptos à reprodução devem apresentar mínimo de 60 pontos nesse índice, e touros com problemas clínicos são inaptos e não devem ser submetidos à CAP.

Animais *Bos taurus indicus*, normais e adultos, devem apresentar valores mínimos para comprimento e largura dos testiculares de 12 x 8 cm, respectivamente, e a forma dos testículos ovalada sendo mais alongada nos zebuínos (VALE FILHO, 2001). Cordões espermáticos curtos, assimétricos, ou excessivamente distendidos devem ser descartados, a pele do escroto deve estar íntegra, e o prepúcio e pene normais. A consistência testicular também deve ser verificada, sendo normal numa escala de 1 – 5 = 5 (VALE FILHO et al, 2010).

Existem também os indicadores moleculares da fertilidade, como as proteínas do plasma seminal, sendo algumas mais prevalentes em animais de alta fertilidade e outras mais prevalentes em animais de baixa fertilidade (KILLIAN et al, 1993). Há, também, proteínas que exercem influência sobre a congelabilidade do sêmen (RONCOLETTA et al, 1999; JOBIM, 2003).

3.4. PLASMA SEMINAL

O plasma seminal é a parte fluida do sêmen constituída de aminoácidos, açúcares, ácido cítrico, minerais, fosfatase, prostaglandinas e proteínas de uma variada faixa de massa molecular (BARTH e OKO, 1989).

Serve como importante veículo para os espermatozoides ejaculados, consistindo em uma mistura de secreções dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias, com função carreadora dos gametas masculinos até o trato genital feminino, viabilizando o processo de fertilização (MANJUNATH, 1987; RONCOLETTA et al, 1999).

O fluido seminal adicionado durante a ejaculação serve como veículo, estimula o metabolismo do espermatozoide e fornece a energia necessária para a passagem através do útero. Além disso, pode influenciar a fertilidade do touro através de proteínas nele contidas (KILLIAN et al, 1999; SALVADOR, 2005).

O plasma seminal de touros de alta fertilidade quando misturados ao plasma seminal de touros de baixa fertilidade aumenta a taxa de fusão dos gametas. Isto demonstra que há componentes presentes no plasma seminal capazes de influenciar a fertilidade (MILLER, 2001 citado por FOLHADELLA, 2007).

3.5. PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL

As proteínas encontradas no sêmen dos animais domésticos podem ser de origem testicular, epididimária ou produzidas pelas glândulas sexuais acessórias, podendo permanecer no fluido seminal ou ainda se ligarem à membrana espermática durante a ejaculação, com atividades biológicas diversas relacionadas à fecundação (SALVADOR, 2005).

LARSON e SALISBURY (1954) foram os pioneiros nos estudos eletroforéticos das proteínas do plasma seminal, e notaram uma natureza heterogênea dessas proteínas, e três principais dentre as onze encontrados. Além disso, houve uma similaridade nos padrões eletroforéticos de proteínas obtidas de touros de raças e idades diferentes. Já em 1956, SZUMOWSKY citado por ROCHA (1972), determinou sete frações proteicas e encontrou correlação na concentração da fração

albumina com a porcentagem de anomalias primárias dos espermatozoides (cabeça e peça intermediária) e com a taxa de fecundação dos touros estudados.

ROCHA (1972) trabalhando com 46 touros de raças zebuínas, normais e com alterações reprodutivas, obteve oito frações proteicas e encontrou diferença significativa entre a proteína total de touros normais e os hipoplásicos, sendo menor neste último grupo de animais. Além disso, a albumina mostrou-se elevada em relação à de touros normais, e quanto às globulinas, houve diminuição da alfa2, beta2 e gama2 e aumento na alfa1.

Um importante grupo de proteínas presentes no plasma seminal são as proteínas ligadoras da heparina, as quais são produzidas pelas glândulas sexuais acessórias dos machos. Presentes em maior quantidade no plasma seminal de bovinos estão as chamadas BSP (bovine seminal plasma proteins) produzidas pelas glândulas vesiculares (MANJUNATH, 1987). Essas proteínas parecem ter grande importância na modulação da capacitação do espermatozoide pela heparina (MILLER, 1990).

Dentre as proteínas presentes no plasma seminal, destaca-se a “Proteína Ácida do Plasma Seminal” (aSFP) com peso molecular de 12,9 kDa, secretada pelas vesículas seminais, ampolas e epidídimos, as quais tem - se demonstrado boas marcadoras bioquímicas para a alta fertilidade de touros (FOLHADELLA, 2007). Dentre suas atividades biológicas estão a atuação como fator decapacitante, preservação da integridade acrossômica e a regulação da motilidade espermática (SALVADOR, 2005).

Em um estudo com touros holandeses, MOURA et al (2006), verificaram que a presença em maiores quantidades de osteopontina de 55 kDa e fosfolipase A2 de 58 kDa, e menor expressão de espermedesina de 14 kDa isoforma Z13 estão associadas a alta fertilidade desses animais. Já KILLIAN et al (1999) encontram duas proteínas (16 kDa, pI= 4,1; 16 kDa, pI=6,7) em maior prevalência em touros de baixa fertilidade.

Touros com sêmen de alta congelabilidade apresentam diferenças marcantes quanto à expressão de grupos de proteínas de alto peso molecular quando comparados com animais de sêmen de baixa congelabilidade, como verificado por RONCOLETTA et al. (1999), que encontraram uma cadeia polipeptídica, de peso molecular aproximado 61.800 Da, sempre presente no grupo de animais de alta congelabilidade e sempre ausente nos de baixa congelabilidade. SALVADOR

(2005) trabalhando com touros Nelore jovens encontrou proteínas com afinidade a heparina de 14, 18, 21 e 29 kDa associadas com a reação acrossômica induzida, se constituindo, portanto, como potenciais marcadores bioquímicos para alta fertilidade nesses animais.

FOLHADELLA (2007), estudando o perfil proteico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir, encontrou diferenças na fertilidade dos animais na fertilização in vitro, e atribuiu essa causa a uma provável diferença na composição química do plasma seminal e membrana espermática em função das diferenças individuais entre touros.

Os perfis eletroforéticos das proteínas do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica, em casos de infertilidade em touros (MANJUNATH, 1987; RONCOLETTA et al, 1999). Dessa forma, tem-se uma ferramenta a mais no diagnóstico de determinadas patologias reprodutivas do touro.

3.6. ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)

O termo proteômica refere-se ao estudo do conjunto das proteínas presentes no fluidos corporais em condições e/ou momentos distintos, e que são responsáveis pelo controle dos processos biológicos (JENSEN, 2004). As principais técnicas utilizadas na proteômica são a eletroforese bidimensional (2 – DE) e a espectrometria de massa.

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração de moléculas carregadas, de acordo com seu ponto isoelétrico, em função da aplicação de um campo elétrico em uma solução (ROCHA, 2005).

Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas em duas etapas consecutivas: primeiro, através da focalização isoelétrica (IEF), as moléculas migram em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado ou gerado por tampões anfotéricos, até atingirem um ponto (pH) no qual sua carga é igual a zero (ponto isoelétrico). Na segunda etapa as proteínas sofrem uma eletroforese em direção perpendicular à IEF em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), e separadas de acordo com sua massa molecular (BARBOSA et al, 2012; ONG e PANDEY, 2001). Os géis são, então, corados com azul de Cromassie ou outros corantes comerciais para tornar visíveis as bandas proteicas ou “spots” (BARBOSA et al, 2012). Após os

processos de separação e coloração, o mapa proteômico gerado é analisado em programas de computador específicos.

Os “*spots*” identificados são então retirados do gel e digeridos pela tripsina e os fragmentos gerados são analisados por espectrometria de massa que consiste basicamente na ionização dos fragmentos e na razão massa/carga dos íons. Os resultados de massa obtidos nesse processo são confrontados com dados depositados em bancos internacionais, disponíveis principalmente pela internet, para a identificação das proteínas (TRINDADE, 2011).

As informações obtidas por meio de estudos proteômicos são cada vez mais completas, e estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais, bem como outras informações fundamentais sobre estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos (ROCHA, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, na reunião do dia 23/11/2011, e protocolado no Programa de Pós – Graduação em Ciência Animal – EV/UFMG com o número de protocolo 227/11.

4.1. PROPRIEDADES

O presente estudo foi desenvolvido por meio de exames clínico – andrológicos e coletas de sêmen realizadas em seis fazendas particulares distribuídas no Estado de Minas Gerais: sendo que as fazendas 1, 2 e 5 localizam-se na região central do Estado. O clima da região é do tipo subtropical úmido (classificação climática de Köppen-Geiger: Cwa), a temperatura anual média de 20,9 a 22,1 °C e precipitação média de 1.328,7 a 1.442,0 mm; (BRASIL, 1992). Os animais foram criados a pasto recebendo suplementação nutricional no período chuvoso. No período seco receberam silagem de milho ou cana-de-açúcar com suplementação concentrada. A produção de leite média anual por matriz era de 5.000 a 6.000 kg.

A fazenda 3 localiza-se na região Norte do Estado, o clima é do tipo tropical com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Aw), temperatura anual média de 24,5 °C e precipitação anual média de 876 mm, (BRASIL, 1992). Os animais foram manejados a pasto no

período chuvoso com suplementação nutricional. No período seco receberam silagem de milho com suplementação concentrada. A produção de leite média anual por matriz foi de 5.500 kg.

A fazenda 4 localiza-se na região Centro-Oeste do Estado, onde o clima é do tipo subtropical úmido (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cwa), com temperatura anual média de 20,7 °C e precipitação anual média de 1.426,3 mm (BRASIL, 1992). Os animais foram manejados a pasto no período chuvoso com suplementação nutricional. No período seco receberam silagem de milho ou cana-de-açúcar com suplementação concentrada. A produção de leite média anual por matriz foi de 5.500 kg.

A fazenda 6 localiza-se na região Norte do Estado, o clima é do tipo tropical com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Aw), temperatura anual média de 24,4 °C e precipitação anual média de 916 mm (BRASIL, 1992). Os animais receberam manejo extensivo (SS), com fornecimento de sal mineral *ad libitum*. A produção de leite média anual das matrizes foi de 2.500 kg.

4.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram submetidos à avaliação andrológica 311 touros Gir - Leiteiro (2009-2012), resultantes de seleções prévias ao desmame e ao sobreano com eliminação daqueles com problemas fenotípicos facilmente detectáveis, e dos quais, 240 se apresentaram cronologicamente adultos (23-60 meses). Destes, 168 apresentaram-se clinicamente normais, enquanto 18 foram diagnosticados com hipoplasia testicular, possuindo sêmen de baixa qualidade. O restante dos animais adultos (n = 54) apresentavam outros distúrbios espermáticos como imaturidade sexual, maturidade sexual retardada, criptoquidismo, espermiogênese imperfeita, degeneração testicular e disfunções da cabeça e da cauda do epidídimo (VALE FILHO et al., 2013).

Dentre os 18 animais diagnosticados com hipoplasia testicular, 9 foram utilizados neste experimento. No estudo, amostras de cada animal hipoplásico foi pareada com amostras de animais normais de mesma idade (variando de 23 a 55 meses) e condição corporal similar, constituindo, portanto, um grupo de 18 animais estudados.

Para cada animal foi anotado: o nome, o número de registro, a data de nascimento, o nome do pai, o nome da mãe, bem como o peso vivo (PV), a circunferência escrotal (CE) e as biometrias dos testículos no momento da realização das coletas de sêmen.

4.3. EXAME ANDROLÓGICO

A circunferência escrotal (CE) foi mensurada com fita milimétrica no seu local de maior diâmetro, envolvendo ambas as gônadas e pele escrotal (Figura 1). O comprimento e largura dos testículos direito e esquerdo foram mensurados individualmente com a utilização de um paquímetro (Figura 2). Pela biometria foi estabelecido o volume testicular utilizando-se a fórmula proposta por FIELDS et al. (1979) e UNANIAN et al. (2000): $VOL = 2 [(r^2) \times \pi \times h]$, onde r = raio calculado utilizando a largura (LT/2), h = comprimento testicular, e $\pi = 3,14$.

As amostras de sêmen dos 311 animais foram coletadas através de eletroejaculação e armazenadas em tubos cônicos graduados. No momento da colheita, uma gota do sêmen foi posicionada em lâmina para avaliação do turbilhonamento espermático (1-5), outra gota foi posicionada em lâmina sob lamínula para a avaliação da motilidade espermática progressiva retilínea (MOT - % de espermatozoides móveis) e do vigor espermático (1-5) em microscopia ótica com aumento de 100 x. Uma alíquota de 20µl da amostra de sêmen foi diluída em 1000µl de uma solução do formol-salino a 1% para posterior avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer. Outra alíquota de sêmen foi utilizada para avaliação da morfologia espermática (percentual de defeitos espermáticos maiores (DM), menores (dm) e totais (DT) e de espermatozoides normais (CBRA, 1998) em preparação úmida para microscopia de contraste de fases. Tais amostras foram analisadas no Laboratório “Multi-Usuário”, do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG.



Fig. 1: Mensuração da circunferência escrotal.



Fig. 2: Mensuração individual do comprimento de cada testículo.

4.4. AVALIAÇÃO PROTEICA DO SÊMEN

Do sêmen obtido por eletroejaculação, uma fração de 1 mL foi diluída na proporção de 1:1 em uma solução tampão (Tris base 40mM, CaCl₂ 2mM, Azida Sódica 0,01%, Pepstatina A 1 μ M, PMSF 1mM) e imediatamente congelada a -196°C em nitrogênio líquido e armazenada no Laboratório “Multi-Usuário”, do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG. A avaliação proteica foi realizada no Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob coordenação do Prof. Arlindo Moura.

4.4.1. Preparação das amostras e quantificação proteica

As amostras de sêmen foram descongeladas à temperatura ambiente (em torno de 25°C) e centrifugadas a 700g, 4 °C, por 15 minutos. Em seguida, foi retirado o sobrenadante das amostras e feita nova centrifugação a 10000g, 4 °C, 60 minutos (MOURA et al., 2006).

A quantificação proteica se deu pelo método de BRADFORD (1976). Inicialmente, uma curva analítica de calibração foi feita a partir de concentrações conhecidas da proteína albumina sérica bovina (BSA), 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 µg. As amostras foram diluídas em proporções de 1:50, 1:20, 1:10 e 1:100 (v/v) em água Milli-Q, com volume final de 100 µL, e mensuradas em triplicatas. Em seguida, foram misturadas a 1 mL do reagente de Bradford e após 10 minutos de incubação foi feita a leitura de absorbância a 595nm. A partir das médias de absorbância obtidas pelas triplicatas foi estabelecida a curva de calibração pela qual foi possível estabelecer a quantidade de proteína total de cada amostra em estudo.

Volumes das amostras do plasma seminal, variando de 14 µL a 79 µL, contendo 750 µg de proteínas foram misturadas em solução de re – hidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M e 65 mM de DTT, 0,5% v/v IPG BUFFER pH 3 – 10, 0,5% v/v CHAPS e traços de azul de bromofenol) totalizando um volume final de 340 µL de tampão mais proteína. A solução contendo as proteínas foi, então, adicionada em canaletas da bandeja de hidratação junto a tiras de 18 cm IPG (pH 3 – 10, immobiline™ DryStrip; GE Lifesciences, USA) e incubadas por 18 horas.

4.4.2. Eletroforese bi-dimensional (2-DE)

A isoeletrofocalização (IEF) foi conduzida em equipamento Ettan™ IPGphor (GE Lifesciences) a 20 °C com a seguinte programação: 200V por 3 horas, 500V por 1 hora, 1000V por 1 hora, 5000 V por 1 hora em gradiente, 5000V por 1 hora, 5000V por 60000 Vh, 100 v por 12 horas totalizando 71300 Vh.

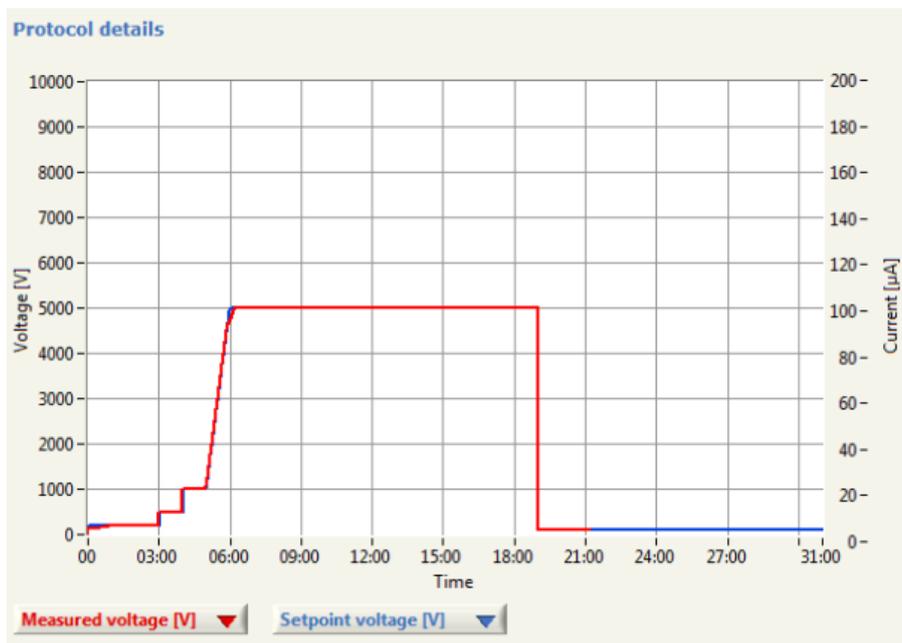


Fig. 3: Protocolo de focalização.

As tiras de re – hidratação foram incubadas, por 15 minutos, em tampão de equilíbrio I (50 mM Solução Tris, Glicerol 87%, Ureia 6M, SDS 2%, traços de azul de bromofenol, DTT 1%) sob agitação moderada na posição horizontal. Foram incubadas, novamente, por mais 15 minutos, em tampão de equilíbrio II (50 mM Solução Tris, Glicerol 87%, Ureia 6M, SDS 2%, traços de azul de bromofenol, iodoacetamida 2,5%) sob agitação moderada na posição horizontal. Na etapa seguinte, as tiras foram fixadas com agarose 0,5% no topo do gel de poliacrilamida (12,5%) em um sistema Dalt-Six (GE Lifesciences) conectado ao resfriador Multitemp II (Amersham). A eletroforese foi feita em corrente constante a 40 mAmp por gel até o início da saída do corante, sendo o tempo de corrida do gel de aproximadamente 10 horas.

Os géis foram retirados da cuba de eletroforese e fixados em solução contendo 30% de etanol e 2% de ácido fosfórico em água destilada, sob agitação moderada por cerca de 24 horas. Em seguida, os géis foram lavados 3 vezes por 20 minutos em solução contendo 2% de ácido fosfórico, 18% de etanol e 15% de sulfato de amônio em água destilada, e então, corados com Coomassie Blue G-250 permanecendo nessa solução por 72 horas. Os géis foram descorados em solução contendo 7% de ácido acético e 40% de metanol em água destilada, sob agitação moderada por 10 minutos e, em seguida, digitalizados utilizando o Image Scanner III (GE Life

Sciences, USA) e as imagens salvas em formato *tagged image file* (.tiff) para análises das imagens (Figura 4).

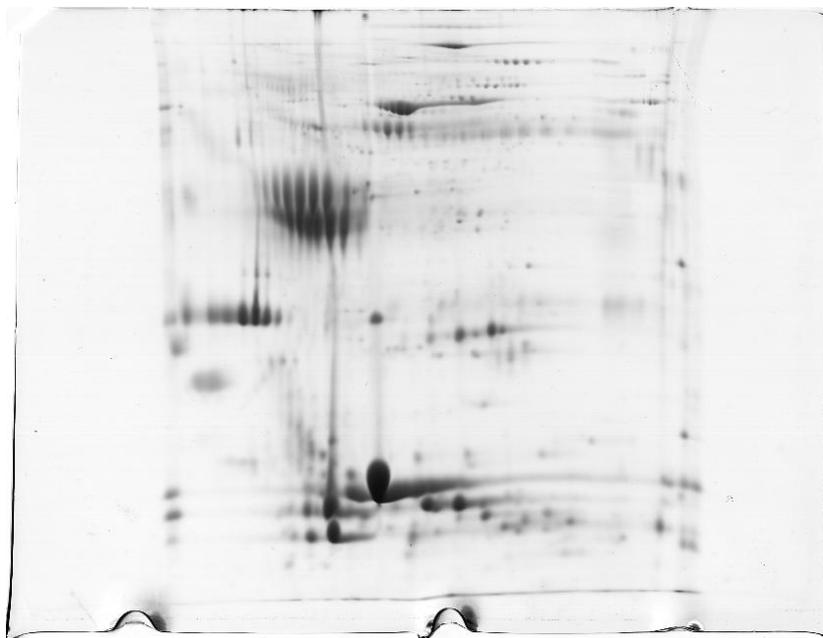


Fig. 4: Gel digitalizado.

4.4.3. Análise das imagens e Resultados

Os géis digitalizados foram analisados pelo programa de computador PDQuest™ 2-D Analysis Software para serem normalizados e para identificar proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de animais hipoplásicos e normais. Um gel referência foi estabelecido com base nos géis dos 18 animais estudados e “spots” presentes de forma consistente nos demais géis foram adicionados ao gel de referência, gerando uma composição sintética, chamada de “MASTER”. Foram selecionados “spots” (pontos de proteínas) característicos de cada grupo e retirados dos géis para identificação por espectrometria de massa.

4.4.4. Identificação das proteínas - (Electrospray ionization quadrupole time-of-flight - ESI/QUAD-ToF)

Os spots correspondentes às proteínas separadas pela eletroforese 2D e selecionadas como diferencialmente expressas nos géis de animais normais e hipoplásicos foram retirados dos géis e

identificadas por EM. Para a seleção foram consideradas diferenças quantitativas e qualitativas entre os pares.

4.4.4.1 Digestão das proteínas

4.4.4.1.1 Espectrometria de Massa

Os “spots” selecionados foram cortados manualmente dos géis em pedaços de aproximadamente 1 mm³ e descorados com 400 µL de solução contendo acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio (50% a 25 mM e pH=8) permanecendo nesta solução por aproximadamente 16 horas. Em seguida, foram desidratados com 200 µL de acetonitrila absoluta durante 5 minutos e secos à temperatura ambiente. As proteínas foram incubadas por, aproximadamente, 20 horas a 37°C com solução contendo tripsina (166 ng/spot), ácido acético 50 mM e diluída com bicarbonato de amônio 50 mM. A extração dos peptídeos foi feita com ácido trifluoracético (TFA) 5%/acetonitrila 50% por 30 minutos e, posteriormente, submetidos a três lavagens. Os extratos foram acondicionados em microtubos e concentrados à vácuo até atingirem um volume final de 10 µL.

Os peptídeos foram misturados com solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% /ácido trifluoracético 0,3% em água, na proporção 1:1,5V/V. 1 mL da mistura foi colocada na placa de MALDI e seco à temperatura ambiente.

Os espectros de massa foram obtidos no modo de refletor de íons positivos, 20000 V de tensão de aceleração com um mínimo de 500 disparos de laser por espectro.

Os espectros iônicos obtidos para cada um dos peptídeos foram submetidos a buscas pela ferramenta MASCOT (www.matrixscience.com) no banco de dados NCBI E SWISSPROT.

4.4.5. Ontologia gênica

Os dados obtidos com a identificação das proteínas pela pesquisa no sistema “MASCOT” foram analisados pelo aplicativo para pesquisas de anotações de proteínas (STRAP). Termos para a ontologia gênica associados a processos biológicos e funções moleculares foram obtidos a partir do UniProtKB.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Experimento foi conduzido sob um delineamento inteiramente casualizado, com nove repetições ($n = 9$) em cada grupo experimental (touros normais – G1 – e touros hipoplásicos – G2). Todas as variáveis estudadas (testiculares, seminais ou proteicas) foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($W, p > 0,05$), e avaliadas quanto à assimetria e a curtose de sua distribuição por meio do procedimento UNIVARIATE, com a opção NORMAL do aplicativo estatístico SAS v. 9,0 (SAS, 2002). As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram submetidas às transformações logarítmicas ($\log(x+1)$) ou angulares ($\arcsen(\sqrt{(x/100)})$) e novamente avaliadas quanto a normalidade segundo descrito acima. As variáveis transformadas que se ajustaram à normalidade foram consideradas paramétricas, e aquelas que não se ajustaram foram consideradas não-paramétricas.

As variáveis biométricas (comprimento, largura e volume) testiculares foram comparadas entre gônadas direita e esquerda, pelo teste t pareado, dentro de cada grupo. Inicialmente foram calculadas as diferenças entre testículos direitos (TD) e esquerdos (TE) para cada variável supracitada, e tais diferenças (TD – TE) foram submetidas ao teste t pareado por meio do procedimento UNIVARIATE do SAS.

As demais variáveis paramétricas submetidas à análise de variância por meio de procedimento GLM do SAS, e em seguida comparadas entre os grupos G1 e G2 pelos testes t ou Tukey, segundo o à instabilidade da variável ($CV\% \geq 30\%$ ou $< 15\%$, respectivamente) (SAMPAIO, 2002). As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos segundo o teste de Mann-Whitney (Sampaio, 2002), por meio do procedimento NPAR1WAY com a opção WILCOXON do SAS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA – ANDROLÓGICA

A média de peso corporal e idade entre os grupos de animais hipoplásicos e normais apresentou-se homogênea (Figura 5), uma vez que esses animais foram selecionados a partir da maturidade sexual e pareados de forma similar quanto a idade e peso.

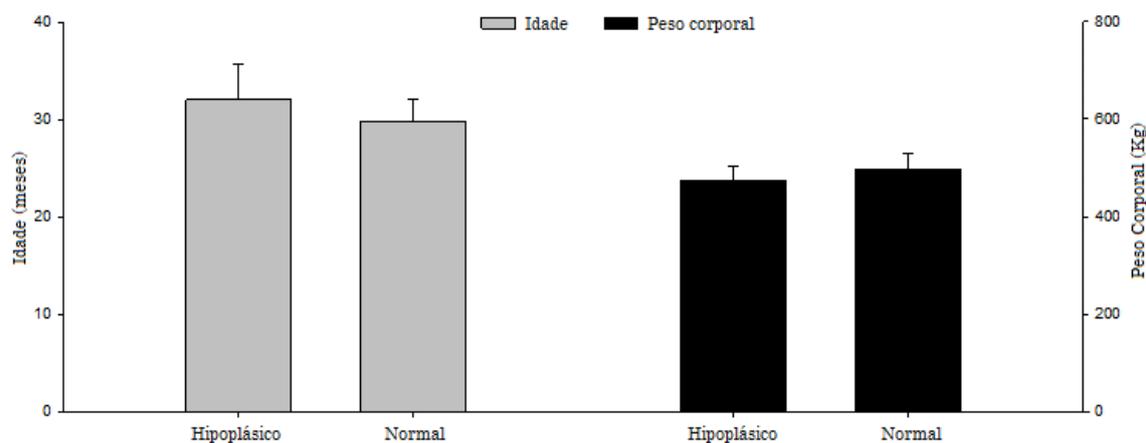


Figura 5: Média de idade (barras cinzas) e peso corporal (barras pretas) entre animais Gir – L hipoplásicos e normais.

A circunferência escrotal (CE) não diferiu entre os dois grupos estudados, apresentando ambos, tamanhos compatíveis com a idade e estágio de desenvolvimento sexual (Figura 6-A). De acordo com CHÁCON et al. (1999) touros zebuínos, à maturidade sexual, para serem considerados normais reprodutivamente devem possuir, no mínimo, 30 cm de circunferência.

A CE dos animais normais apresentou-se semelhante a de touros Gir, participantes de teste de progênie para produção de leite, avaliados por MARTINEZ et al. (2000) quando encontrou uma média de 36,9 cm para touros entre 30 e 60 meses.

Os animais hipoplásicos, apesar de apresentarem CE inferior porém, não significativamente, o que pode ser explicada pelo baixo desenvolvimento dos túbulos seminíferos, ainda assim, esta foi compatível com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Os resultados encontrados corroboram com os encontrados por GOIOZO (2003) que ao comparar o perímetro escrotal de touros da raça Nelore normais e com hipoplasia testicular discreta e moderada, não observou diferença significativa, evidenciando que o diagnóstico dessa patologia, em graus discreto e moderado, por aferições biométricas não se mostra eficiente. O mesmo também foi observado por GOIOZO (2008).

A CE é uma característica comumente utilizada em associação a características seminais e correlacionada com a capacidade reprodutiva (CARTER et al., 1980; QUIRINO, 1999). Apresenta herdabilidade de média a alta, como encontrado por JUNIOR (2009) trabalhando com

animais Gir – Leiteiro ($h^2 = 0,37$) e PEREIRA et al. (2000) trabalhando com animais Nelore ($h^2 = 0,51$) e semelhantes, também, a médias encontradas por outros autores para animais zebuínos. Além disso, DIAS et al. (2008) observou correlações genéticas favoráveis e altas com volume testicular, comprimento e largura dos testículos direito e esquerdo sugerindo a CE como bom parâmetro para programas de seleção para predição do tamanho dos testículos em animais Nelore.

Apesar de ser uma característica que apresenta correlações favoráveis com poder fecundante do sêmen, a circunferência escrotal não deve ser a única utilizada para avaliação da qualidade do sêmen (MARTINEZ et al, 2000). Isto pode ser reforçado pelo encontrado no presente estudo, no qual o grupo de animais hipoplásicos, que apesar de obterem uma circunferência adequada à sua idade e peso e não diferente significativamente, são considerados inaptos à reprodução uma vez que, tal patologia leva à baixa qualidade do sêmen, alta patologia espermática e, conseqüentemente, desempenho reprodutivo e econômico insatisfatórios.

Quando feitas as mensurações individuais em ambos os testículos direito e esquerdo, encontrou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre as médias de comprimento, largura e volume nos touros hipoplásicos, enquanto no grupo de animais normais não foi observada diferença (Figura 6-B). Essa observação quando comparada com as mensurações da CE encontradas nos animais hipoplásicos evidencia o perigo da avaliação desses animais embasada apenas na CE, uma vez que, há assimetria no comprimento e largura entre os testículos esquerdo e direito, apesar de uma CE nos padrões estabelecidos para animais zebuínos à maturidade sexual.

O volume testicular, que leva em conta tanto a largura quanto o comprimento dos testículos, tem relação direta com o número de túbulos seminíferos e por conseguinte, com a produção espermática. Portanto, animais que tenham assimetrias testiculares terão menor volume testicular e portanto uma produção espermática aquém do desejado. UNANIAN et al. (2000) concluíram que ao avaliar um touro jovem, o perímetro escrotal aliado ao volume testicular tornam a seleção desses animais mais precisa.

A diferença observada entre o volume e largura e comprimento entre os testículos direito e esquerdo no grupo de animais hipoplásicos pode ser explicada pela redução da área dos túbulos seminíferos, com presença ou ausência de atividade mitótica, membrana basal espessada e hialinizada com aumento de tecido conjuntivo peritubular do testículo afetado, além de

espermatogônias com baixa atividade mitótica, levando a redução do testículo hipoplásico (NASCIMENTO E SANTOS, 1997).

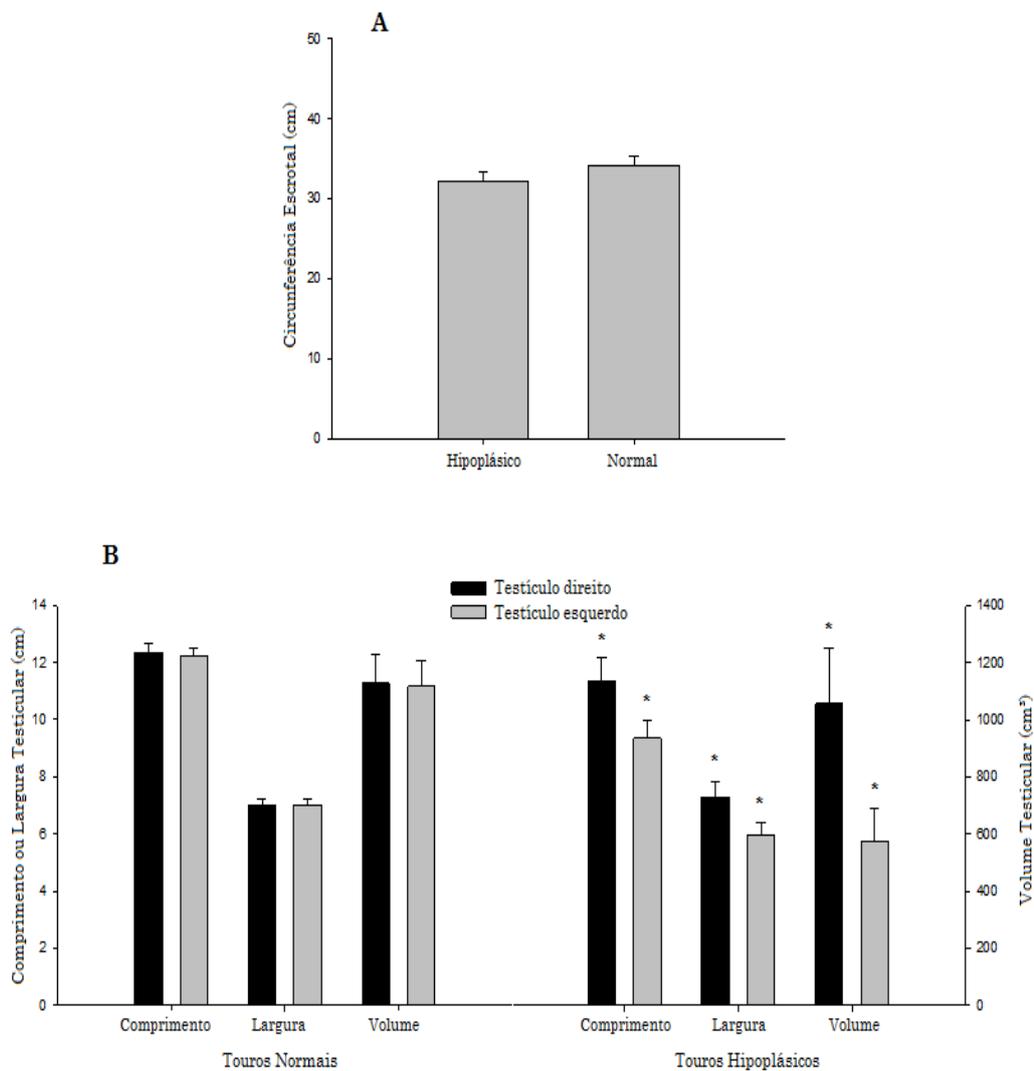


Figura 6. **A:** Médias de circunferência escrotal entre touros Gir – L hipoplásicos e normais. **B:** Médias de comprimento, largura e volume dos testículos direito e esquerdo de touros Gir – L normais e hipoplásicos. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t pareado.

A concentração espermática média dos animais hipoplásicos apresentou-se inferior ($p < 0,05$) a dos animais normais, enquanto o volume do ejaculado entre os grupos não apresentou diferença significativa (Figura 7-A). Animais hipoplásicos por terem menor atividade dos túbulos seminíferos apresentam uma menor produção espermática e, em consequência disso, uma

concentração espermática reduzida, uma vez que esta, expressa a relação entre o número de espermatozoides e o volume do ejaculado. Este último, por ser constituído por secreções dos órgãos acessórios do trato reprodutivo masculino, os quais não parecem sofrer alterações nos animais hipoplásicos, permaneceu semelhante ao volume de ejaculado apresentado por animais normais.

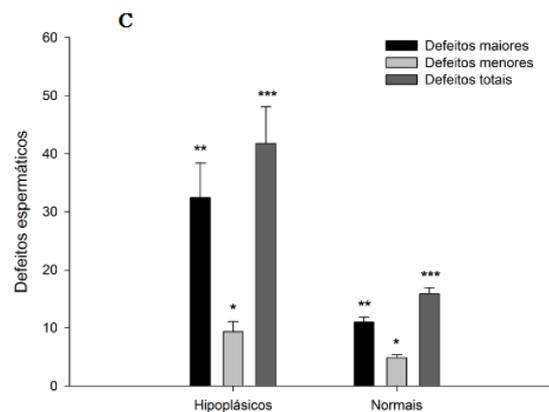
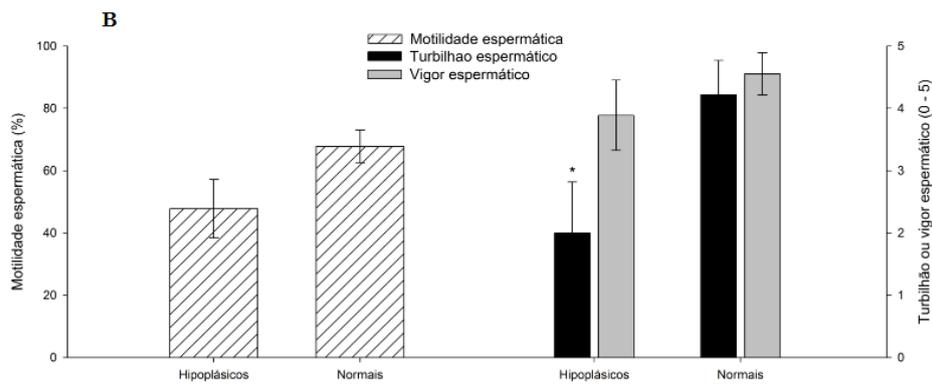
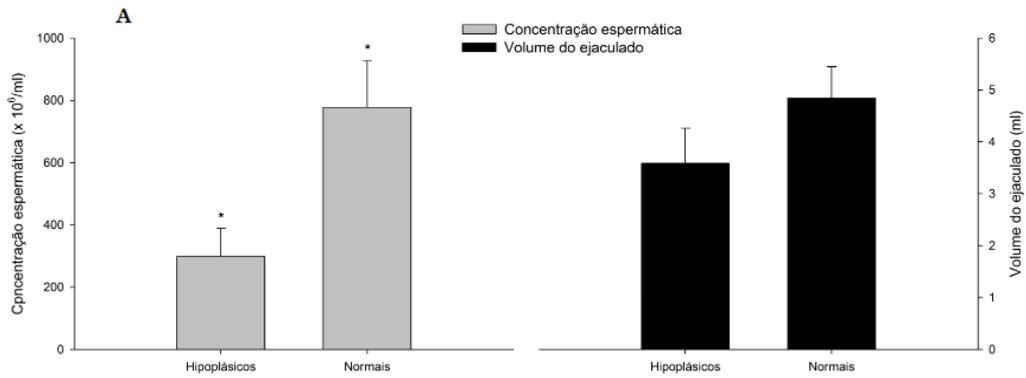


Figura 7. **A:** Médias de concentração espermática (barras cinzas) e volume ejaculado (barras pretas) de touros Gir – L hipoplásicos e normais. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste t de Student. **B:** Média do percentual de espermatozoides móveis (barras hachuradas), turbilhão espermático (barras pretas) e de vigor espermático (barras cinzas) de touros Gir – L hipoplásicos e normais. O asterisco (*) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste t de Student. **C:** Médias de defeitos maiores (barras pretas), defeitos menores (barras cinza claro) e defeitos espermáticos totais (barras cinza escuro). Os asteriscos simples (*), duplo (**) e triplo (***) indicam diferenças significativas pelo teste t de Student a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente.

As características físicas de motilidade espermática e vigor não apresentaram diferença estatística entre os grupos de animais estudados mas, já a motilidade de massa ou turbilhonamento apresentou-se inferior nos animais hipoplásicos ($p < 0,05$) (Figura 7-B).

MOURA (2013) trabalhando com os mesmos animais utilizados neste estudo somados a um número de animais maior, encontrou diferenças significativas entre estes parâmetros, sendo todos inferiores para animais hipoplásicos. O que pode ter levado a esta diferença entre motilidade espermática e vigor é a seleção dos animais feita para a análise proteômica, todos contemporâneos e formando um grupo menor de animais. Apesar disso, diferenças nos valores absolutos entre estas características foram inferiores, o que somado às demais características indesejáveis apresentadas por animais hipoplásicos, evidência a baixa fertilidade destes.

Quanto ao turbilhonamento a diferença observada nos animais hipoplásicos corrobora com o encontrado por outros autores (VALE FILHO et al., 1979; VALE FILHO, 1988; MOURA 2013). Isso decorre da relação apresentada entre a concentração espermática reduzida e o volume do ejaculado que sofreu redução não expressiva quando comparado aos animais normais, resultando num turbilhão inferior ou às vezes ausente.

Animais hipoplásicos apresentaram maior número de defeitos espermáticos (defeitos maiores, menores e total) em relação aos normais ($p < 0,05$) (Figura 7-C). Alta incidência de patologias espermáticas em animais com hipoplasia testicular também foi relatada por outros autores (VALE FILHO et al., 1979; VALE FILHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; MOURA, 2013). Como o testículo afetado apresenta ausência do potencial de desenvolvimento do epitélio espermatogênico e uma falha da espermatogênese, maior incidência de defeitos das células espermáticas são encontrados.

De acordo com o grau de comprometimento do parênquima testicular em animais hipoplásicos, pode-se observar, em maior ou menor grau, alterações no tamanho dos testículos, motilidade espermática, porcentagem de defeitos espermáticos, assim como na fertilidade desses animais (BICUDO et al., 2007; NASCIMENTO E SANTOS, 1997)

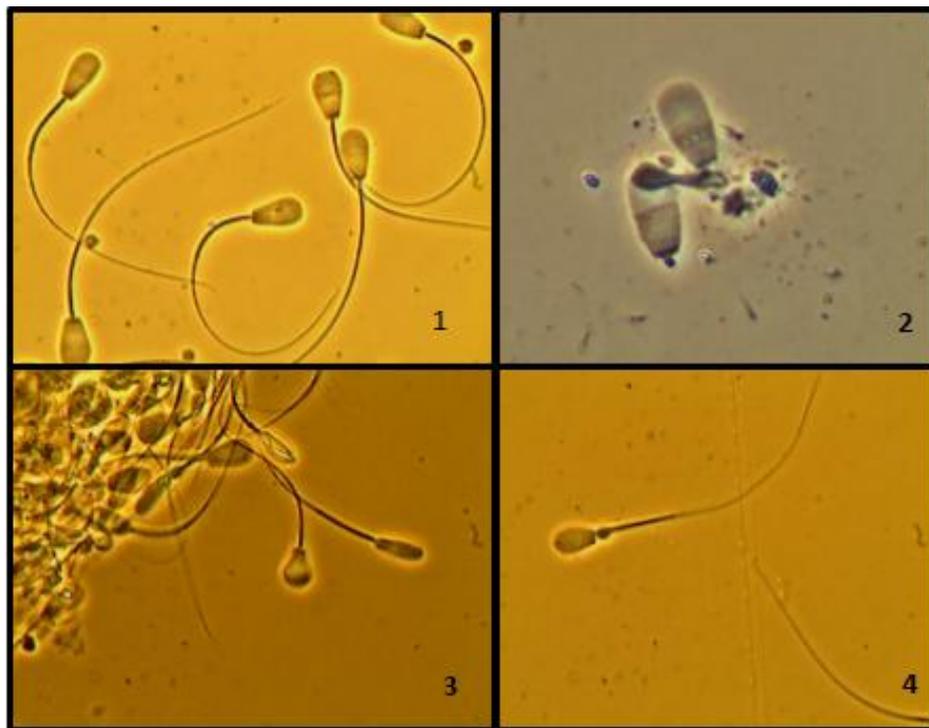


Figura 8: Morfologia espermática de um animal normal e três hipoplásicos; 1: animal clinicamente normal; 2: sêmen apresentando defeitos de peça intermediária e *pouch formation*; 3: espermatozoides com cabeça piriforme; 4: espermatozoides apresentando gota citoplasmática proximal.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL

Foram identificados pela espectrometria de massa 33 “spots” diferenciais entre animais hipoplásicos e normais, correspondendo a 38 proteínas sendo 26 “spots” mais intensamente presentes nos animais hipoplásicos e o restante no grupo de animais normais (Figura 9).

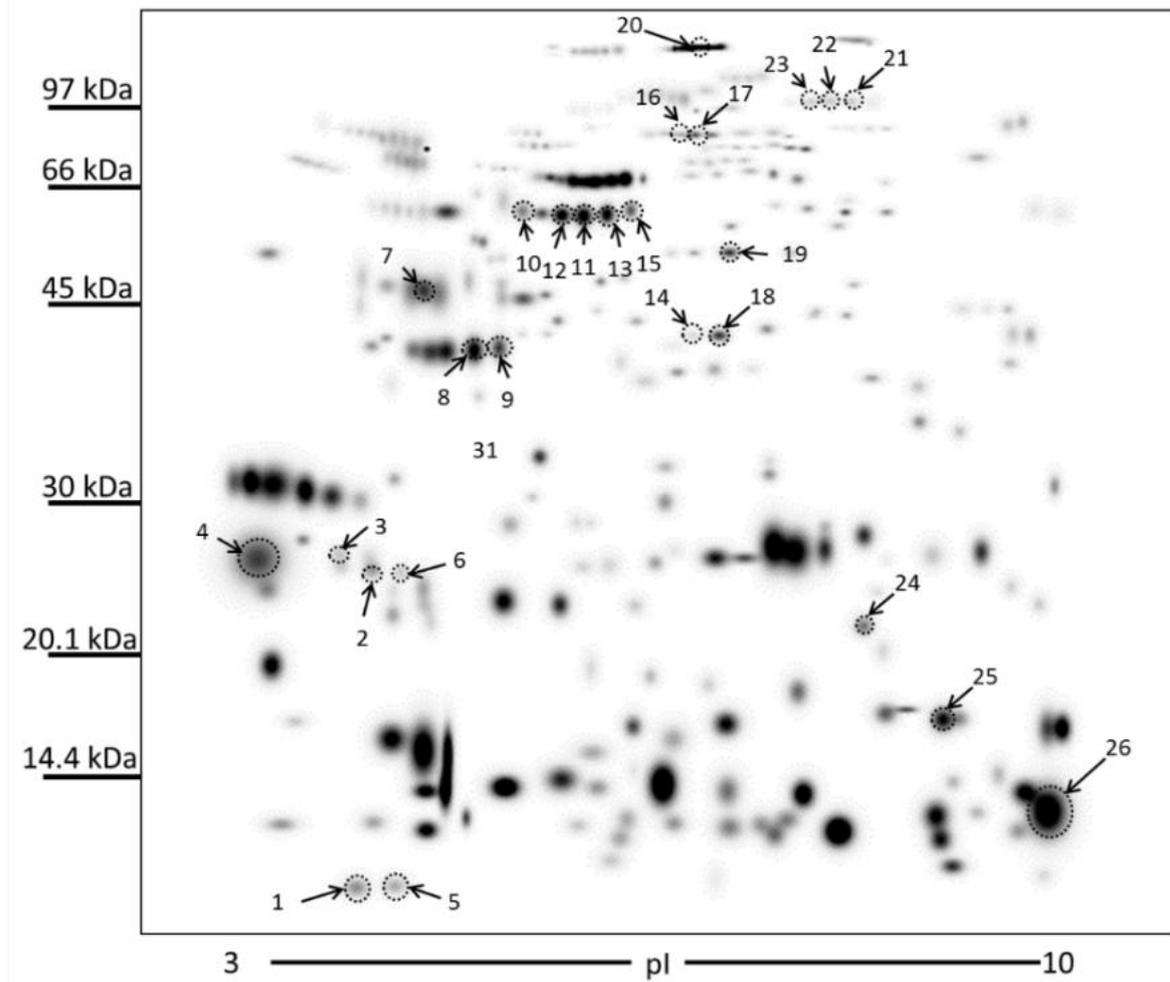


Figura 9: Gel “máster” de proteínas do plasma seminal de touros Gir-Leiteiro adultos. O gel foi obtido a partir de um “match set” com géis de plasma seminal de touros normais (n=9) e hipoplásicos (n=9). As proteínas anotadas referem-se àquelas com maior expressão nos animais hipoplásicos.

O grupo de proteínas conhecido como *Binder of Sperm Proteins* (BSP) esteve presente em diversos “spots” identificados no plasma seminal dos animais hipoplásicos, representado pelas BSP 30 kDa (“spots” 2, 3, 4, 6 e 26) e *Pdc – 109*, conhecida como BSP A1/A2 (“spots” 1 e 5), e *Seminal Fluid Protein A3* (“spot” 8). Esses spots corresponderam, em média, a $52,85 \pm 6,1\%$ da intensidade de todos os “spots” diferencialmente expressos nesse grupo de animais. Essas proteínas são secretadas pelas vesículas seminais e representam a maior parte das proteínas presentes no plasma seminal de bovinos, cerca de 50 a 65% do total. Durante a ejaculação, as BSPs do fluido seminal se ligam à superfície dos espermatozoides e removem uma quantidade

significativa de colesterol acompanhada da liberação de alguns fosfolipídeos alterando a relação colesterol:fosfolipídio e, portanto, aumentando a fluidez da membrana e, conseqüentemente favorecendo a capacitação espermática. Ao mesmo tempo, as BSPs recobrem a superfície dos espermatozoide por meio de interações com colina-fosfolipídeos estabilizando a membrana para evitar o livre movimento destes (MANJUNATH, 1992; THÉRIEN, 2001). Promovem a interação dos espermatozoides com o epitélio do oviduto favorecendo a formação do reservatório espermático e, além disso, prolongam a motilidade dessas células durante a estocagem desempenhando papel fundamental na fertilização (GWATHMEY, 2006). Como os animais hipoplásicos apresentaram uma concentração espermática inferior à dos animais normais sugere-se que as BSPs teriam menos espermatozoides disponíveis para se ligarem e a maior parte dessas proteínas estariam livres no plasma seminal. Outra hipótese, seria o excesso dessas proteínas ligadas aos espermatozoides favorecendo uma pré-capacitação, o que somado às demais características indesejáveis apresentadas pelos touros hipoplásicos, como alta patologia espermática, atuariam como fatores negativos à fertilidade desses animais.

Outra proteína que esteve presente em vários “spots” identificados no plasma seminal dos animais hipoplásicos foi a *platelet-activating factor acetylhydrolase* (PAF – AH) (“spots” 3, 10, 11, 12, 13, 14 e 15). A intensidade desses “spots” correspondeu, em média, a 19, 21±4,4 % da intensidade de todos os identificados nos hipoplásicos. Essa proteína já foi identificada no plasma seminal de bovinos, garanhões, coelhos e galos, e é secretada pelas vesículas seminais e ampolas (SOUBEYRAND et al., 1998). O fator ativador de plaquetas (PAF) estimula a motilidade espermática em humanos e aumenta a taxa de fertilização in vitro em coelhos o que demonstra seu papel na capacitação espermática, e a PAF – AH atua prevenindo esses efeitos evitando uma capacitação precoce. Além disso, previne o dano oxidativo dos espermatozoides por neutrófilos que são ativados pelo PAF (HOUGH e PARKS, 1994).

Outras proteínas e suas isoformas também foram identificadas no plasma seminal desses animais: *WAP four-disulfide core domain protein 2-like*, *phospholipase B-like 1*, *casein alphaS1*, *probable exonuclease mut-7 homolog*, *zinc-alpha-2-glycoprotein precursor*, *mesothelin precursor*, *SLC2A4 regulator-like*, *clusterin preproprotein*, *spermadhesin-1 precursor*, *seminal fluid protein A3*, *Tropomyosin alpha-1 chain*, *carboxypeptidase Q precursor*, *beta-hexosaminidase subunit alpha precursor*, *T-complex protein 1 subunit theta*, *Cathepsin L2*, *secernin-3 isoform X1*, *beta-glucuronidase precursor*, *Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-*

dioxygenase 1, Lactoferrin, Polymeric immunoglobulin receptor, lactoferrin, partial, fructose-1,6-bisphosphatase 1, alpha-enolase, cathepsin D precursor, complement factor H precursor, G-protein coupled receptor 35, complement factor B precursor, epididymal-specific lipocalin-5-like, TPA: bodhesin-4-like, lysozyme-like protein 1 precursor, nerve growth factor, partial (Figura 12).

Os 7 “spots” mais intensamente presentes no plasma seminal dos animais normais foram identificados pela espectrometria de massa como as seguintes proteínas: *Pdc – 109, BSP -30 kDa, galectin-3-binding protein precursor, secernin-3 isoform X1, clusterin preproprotein, phospholipase B-like 1, seminal fluid protein A3 – bovine, spermadhesin-1 precursor, Tropomyosin alpha-1 chain, beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein, serotransferrin, succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial precursor, albumin, inhibitor of carbonic anhydrase precursor.*

Proteínas envolvidas na capacitação espermática, reação acrossômica e fertilização

As espermadesinas são polipeptídeos envolvidos em vários processos da reprodução, estão presentes no plasma seminal de diversas espécies, como varrões, caprinos, bovinos e equinos, possuem habilidade de se ligar à heparina, zona pelúcida e espermatozoides. Parecem desempenhar papel importante na interação espermatozoide – oócito durante o processo de fertilização. As bodesinas tem expressão significativamente maior nas vesículas seminais quando comparadas com outros tecidos, são descritas quatro isoformas (Bdh-1, Bdh-2, Bdh-3 e Bdh-4) as quais apresentam cerca de 97 a 98% de similaridade. *Bodhesin-4*, apresenta um resíduo de arginina da posição 72, assim como as Bdh-1 e Bdh-2, e sua estrutura primária apresenta grande similaridade com outras espermadesinas (MELO et al., 2008). *Spermadhesin-1* constitui o segundo grupo de proteínas mais abundantes no plasma seminal de touros Brahman (RÊGO et al., 2014).

Beta-glucuronidase é uma enzima hidrolítica presente no útero durante o estro, possui a capacidade de remover alguns fatores decapacitantes que recobrem a membrana espermática dos espermatozoides ejaculados. Em coelhos esta enzima se mostrou eficiente em capacitar parcialmente o espermatozoide in vitro (JOHNSON e HUNTER, 1971).

Proteínas envolvidas na motilidade e proteção espermática

Albumin e *clusterin* foram identificadas por MOURA et al., 2010 no fluido da cauda do epidídimo de touros Holandês e são responsáveis por proteger a célula espermática de danos causados por formas reativas de oxigênio que podem se formar durante a maturação espermática. No presente estudo, spots identificados como *clusterin* (8 e 9) foram mais intensos nos animais hipoplásicos, enquanto o spot identificado como *albumin* (32) foi mais intensamente expresso nos animais normais.

Outras proteínas com função protetora também foram identificadas em maiores intensidades no plasma seminal dos animais hipoplásicos, como *Lactoferrin* que é um quelante metálico e se liga ao ferro atuando como agente antimicrobiano e protetor dos espermatozoide contra os efeitos da peroxidação lipídica. É encontrada no plasma seminal de humanos, varrões, equinos (INAGAKI, 2001). Em humanos, sua concentração no plasma seminal foi maior em casos de oligospermia (BUCKETT et al., 1997). *Serotransferrin* é também uma proteína com habilidade de ligar ao ferro e realizar seu transporte a partir de locais de absorção e degradação de radicais heme para locais de estocagem e utilização. Além disso, pode ter também um papel na proliferação celular. Foi encontrada no plasma seminal de bovinos por KELLY et al., 2006.

Complement factor B, *Complement factor H* e *T-complex protein 1 subunit theta* agem como chaperonas (ROMMELAERE et al., 1993), protegendo as células dos danos causados pela precipitação proteica e ações do sistema complemento. *Complement factor H*, foi encontrado no sêmen de varrões e a associação da intensidade dos spots nos quais foi encontrada com defeitos espermáticos de peça intermediária sugeriram que um aumento dessa proteína inicialmente reduziria a porcentagem de células anormais porém, sua expressão contínua seria deletéria para a qualidade espermática (GONZÁLEZ-CADAVID et al., 2014). *Polymeric immunoglobulin receptor*, protege a integridade da mucosa do trato reprodutivo contra agentes infecciosos. É responsável pelo sistema de imunidade de mucosa e precursora da *secretory immunoglobulin A* (UREN et al., 2003).

Lisozima é conhecida por sua atividade antibacterina em muitos organismos, incluindo invertebrados, plantas, peixes e mamíferos (PRAGER E JOLIES, 1995). *Lysozyme like protein 4* já foi encontrada na superfície de espermatozoides de bovinos (BYRNE et al., 2012), e este é o primeiro trabalho a encontrar *Lysozyme like protein 1 precursor* no plasma seminal de bovinos.

As carboxypeptidases são sintetizadas pelo trato reprodutivo dos machos e em humanos participam no controle da fertilidade e motilidade espermática por meio da ativação ou inativação de hormônios peptídicos pela clivagem do grupo C-terminal de aminoácidos básicos (SKYDGEL et al., 1998). *Carboxypeptidase Q* também foi encontrada por REGO, 2014 no plasma seminal de touros *Bos indicus*.

A *Zync-alpha-2-glycoprotein* (ZAG-2) foi descrita pela primeira vez no plasma seminal de bovinos por REGO, 2014. Se liga à membrana espermática e é responsável pela regulação da motilidade espermática por meio da via de sinalização do AMP cíclico (FEI QU et al., 2007). Em carneiros, SOLEILHAVOUP et al., 2014, encontraram associação negativa entre a quantidade de ZAG-2 e a motilidade espermática após 24 horas de preservação do sêmen em estado líquido. Observou-se que essa proteína fez aumentar a velocidade de esperma após um curto tempo de incubação, mas esse estímulo era então prejudicial à preservação do esperma após 24 h de preservação. Confirmou-se, por conseguinte, um efeito bifásico da ZAG-2 em mobilidade do espermatozoide, dependendo da duração da sua interação com essas células.

Fructose-1,6-bisphosphatase 1 é um importante componente da via da glicólise, e sendo a glicose importante fonte de energia utilizada pelo espermatozoide, esta enzima proporciona uma maior eficiência do metabolismo energético para a motilidade espermática. São de origem citosólica e podem ser encontradas no plasma seminal como um processo normal de liberação a partir dos espermatozoides, em decorrência da morte da morte de células com danos na membrana citoplasmática ou, também, a partir da liberação de gotas citoplasmáticas, um remanescente da parte citoplasmática dos espermatozoides (SOLEILHAVOUP et al., 2014).

Proteínas associadas com a maturação espermática

WAP four-disulfide core domain protein 2-like, é uma proteína derivada do epidídimo encontrada no plasma seminal de bovinos, sua possível ação seria na maturação espermática (KELLY, 2006).

A *alpha-enolase* é uma enzima presente no fluido epididimário de touros *Bos taurus* (MOURA et al., 2010) durante a maturação espermática hidrolisa açúcares presentes na membrana espermática. Foi encontrada, também, associada à membrana espermática de carneiros Morada Nova (VAN TILBURG et al., 2013).

As *cathepsins* foram encontradas em maior expressão no fluido da cauda do epidídimo de touros da raça Holandesa de alta fertilidade quando comparados com touros de baixa fertilidade (MOURA et al., 2006). Participam da remodelação proteolítica da membrana espermática durante o trânsito epididimário.

Outras proteínas

Nerve growth factor é uma proteína que regula o desenvolvimento e função normal de neurônios sensoriais e simpáticos e de células cromafins da adrenal. Foi purificada, em quantidades significativas, do plasma seminal de bovinos por HARPER et al., 1982. Acredita-se que tenha várias atividades biológicas semelhantes a *Nerve growth factor* encontradas nas glândulas submandibulares de ratos (HARPER et al., 1983).

Casein alpha S1 é uma proteína usualmente expressa pelas células epiteliais da glândula mamária. Foi encontrada no tecido e fluido prostático de homens com hiperplasia benigna de próstata (HBP) mas não no tecido normal e de pacientes com câncer de próstata, sendo sugerida como um marcador para o diagnóstico da hiperplasia prostática benigna (XU et al, 2006). No plasma seminal de bovinos essa proteína ainda não havia sido encontrada, podendo indicar alguma relação com a hipoplasia testicular da mesma forma que para HBP, porém nada pode ser afirmado sendo necessário maiores investigações.

Galectin-3-binding protein foi encontrada por MOURA et al., 2010 no fluido epididimário de touros da raça Holandesa e atua na adesão das células mediada por integrinas.

Outras proteínas encontradas, como *probable exonuclease mut-7 homolog*, *SLC2A4 regulator-like*, *G-protein coupled receptor 35*, *phospholipase B-like-1* e *Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1* não encontram-se descritas na literatura como presentes no plasma seminal de bovinos e portanto não se sabe qual papel desempenham neste fluido.

De acordo com os termos da ontologia gênica, os processos biológicos mais relacionados a animais hipoplásicos foram processos celulares e de regulação. As funções moleculares mais relacionados a esse grupo de animais foram de ligação e atividade catalítica (Figuras 10 e 11).

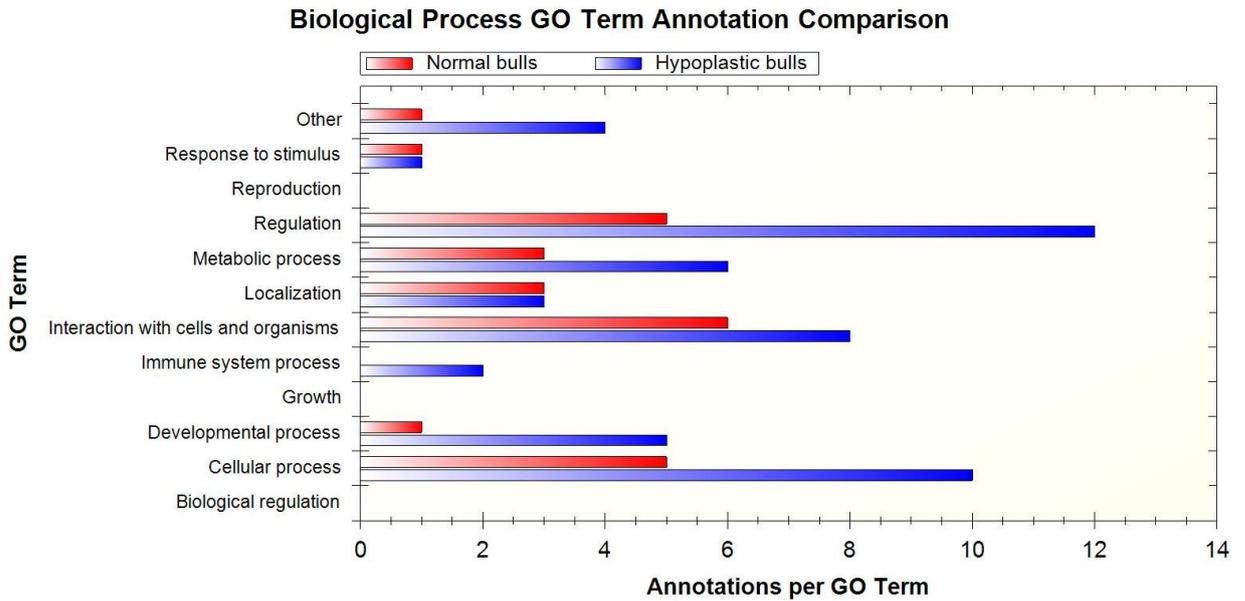


Figure 10. Biological process annotations for gene ontology of differentially expressed seminal plasma proteins of Gyr bulls.

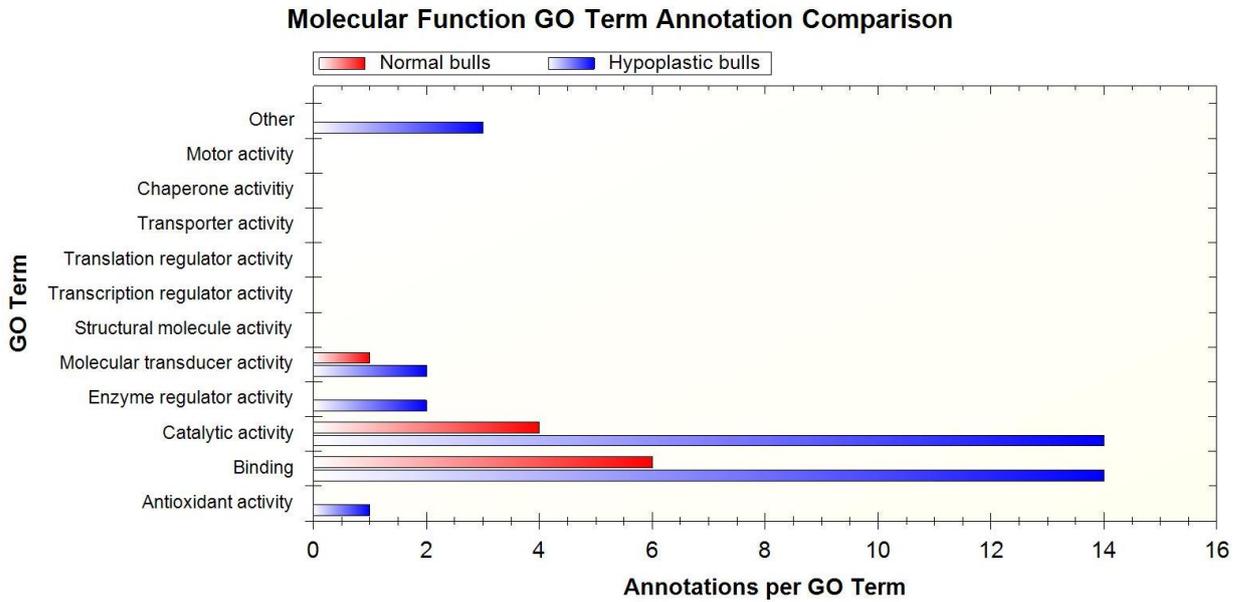


Figure 11. Molecular function annotations for gene ontology of differentially expressed seminal plasma proteins of Gyr bulls.

6. CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho que identificou as proteínas do plasma seminal diferencialmente expressas entre touros Gir – Leiteiro com hipoplasia testicular e clinicamente normais.

De acordo com a ontologia gênica foram identificadas proteínas com funções variadas ligadas à reprodução, algumas destas já encontradas no plasma seminal de bovinos outras identificadas pela primeira vez. Entretanto, não se pode afirmar que o fato de algumas proteínas terem sido encontradas no plasma seminal de touros hipoplásicos de forma mais intensa que em touros normais tenha ligação com a presença dessa patologia. Mais estudos são necessários na busca por uma proteína que possa ser utilizada como marcadora para o diagnóstico da hipoplasia.

Apesar de terem sido identificadas no plasma seminal desses animais muitas proteínas ligadas positivamente à fertilidade, sugere-se que outros fatores podem estar atuando no plasma seminal desses animais ou mesmo nas células espermáticas, influenciando ou modulando a ação dessas proteínas. Dessa forma, este trabalho abre caminhos para mais estudos sobre a subfertilidade em animais hipoplásicos e os componentes presentes no plasma seminal desses animais. Sabe-se, que as proteínas interagem com outros elementos presentes no plasma seminal, como por exemplo hormônios, podendo estes e outros componentes presentes no sêmen de animais hipoplásicos influenciarem a expressão e ação dessas proteínas.

Animais hipoplásicos apresentam características seminais indesejáveis para um reprodutor, alta patologia espermática, baixa concentração e assimetrias testiculares. Porém, são animais que apresentam libido e capacidade fecundante, ainda que reduzida, o que os torna um risco para a atividade reprodutiva, pois sendo subférteis terão piores resultados reprodutivos e se não diagnosticados com tal patologia poderão servir de reprodutores por anos e disseminar o gene ligado à hipoplasia testicular entre seus descendentes. Portanto, animais com tal condição devem ser eliminados do rebanho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCGIL. Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro. Disponível em <http://www.girleiteiro.org.br/associacao.php> Acessado em 28/08/2014.

ACGZ. Associação do Criadores Gaúchos de Zebu. Disponível em <http://www.acgz.com.br/> Acessado em 28/08/2014.

AMCGIL. Associação Mineira dos Criadores de Gir Leiteiro. Disponível em <http://amcgil.webnode.com/a-ra%C3%A7a/> Acessado em: 28/08/2014.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Disponível em <http://www.asbia.org.br/> Acessado em 28/08/2014.

BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras.*, v.58, n. 3, p. 366 – 375, 2012.

BARROS, T.B., GUIMARÃES, D.B., ARAÚJO, L. R. S. et al. O estudo proteômico e seu potencial de avaliação da fertilidade em machos de diferentes espécies domésticas. *Ver. Bras. Reprod. Anim.* v. 37, n.3, p,266 – 271, 2013.

BARTH, A.D., OKO, R.J. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p. 248–254, 1976.

BICUDO, S.D.; SIQUEIRA, J.B.; MEIRA, C. Patologias do Sistema Reprodutor de Touros. *Biológico*, v. 69, n.2, p. 43-48, 2007.

BUCKETT, W. M.; LUCKAS, M. J. M.; GAZVANI, M. R. et al. Seminal Plasma Lactoferrin Concentrations in Normal and Abnormal Semen Samples. *J. of Androl.*, v. 18, n.3, 1997.

BYRNE, K; LEAHY, T.; MCCULLOCH, R. et al. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics*, v. 12, p. 3559 – 3579, 2012.

CARTER, A. P.; WOOD, P. D. P.; WRIGHT, P. A. Association between scrotal circumference, live weight and sperm output in cattle. *J. Reprod. Fert.*, v. 59, p. 447 – 451, 1980.

CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. – Belo Horizonte, 1998, 49 p.

CHÁCON, J.; PÉREZ, E.; MÜLLER, E. et al. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. *Theriogenology*, v.52, p. 221-231, 1999.

DIAS, J.C.; ANDRADE, V. J.; MARTINS, J. A. M. et al. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. *Pesq. agropec. bras.*, v.43, n.1, p. 53-59, 2008.

FEY QU; YING, X.; GUO, W. et al. The role of Zn-a2 glycoprotein in sperm motility is mediated by changes in cyclic AMP. *Reproduction*, v. 134, p. 569 – 576, 2007.

FOLHADELLA, I.M.; VALE FILHO, V.R. Perfil Protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária,

GARCIA, O. S. Características físicas e morfológicas de sêmen de touros normais e de touros com distúrbios reprodutivos de raças europeias e indianas, criadas no estado de Minas Gerais. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1971. 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária.

GOIOZO, P. F. I.; LIMA, J. P.; DI SANTIS, G. W. *et al.* Hipoplasia testicular (discreta e moderada) e sua correlação com o perímetro escrotal em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.3, p.559 – 560, 2003.

GOIOZO, P. F. I. Influência das alterações testiculares diagnosticadas pela histopatologia sobre as características biométricas, morfométricas e seminais em touros da raça Nelore. São Paulo. Universidade Estadual Paulista, 2008. 57p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J. A. M.; MORENO, F. B. *et al.* Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology*, p.1 – 11, 2014.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L. *et al.* Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3 and BSP-30-kDa share functional roles in the storing sperm in the oviduct. *Biol. of Reprod.*, v.75, n.4, p. 501 – 507, 2006.

HARPER, G. P.; GLANVILLE, R. W.; THOENEN, H. The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. *The J. of Biol. Chem.*, v.257, n. 14, p. 8541 – 8548, 1982.

HARPER, G.P.; BARDE, Y.A.; EDGAR, D. *et al.* Biological and immunological properties of the nerve growth factor from bovine seminal plasma: comparison with the properties of mouse nerve growth factor. *Neuroscience*. vol. 8, n. 2, p. 375 – 387, 1983.

INAGAKI, M., KIKUCHI, M., ORINO, K. *et al.* Seminal Plasma Lactoferrin Concentrations in Normal and Abnormal Semen Samples. *J. Vet. Med. Sci.*, v.64, n.1, p.75 – 77, 2002.

JENSEN, O. N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.8, p.33 – 41, 2004.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. *Acta Scien. Vet.*, v. 31, n.1, p. 21 – 30, 2003.

JOHNSON, W. L.; HUNTER, A. H. Seminal antigens: their alterations in the genital tract of female rabbits and during partial in vitro capacitation with beta amylase and beta glucuronidase. *Biol. of Reprod.*, v.7, p. 332 - 340, 1971.

KASTELIC, J. P. Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology*, v. 81, p. 18 – 23, 2014.

- KELLY, V.C.; KUY, S.; PALMER, D. J. et al. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics*, v. 6, p. 5826 – 5833, 2006.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; CANCEL, A.M. et al. Male factors affecting sperm fertility. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.2, p.83-85,1999.
- KUMAR, P.; KUMAR, D.; SINGH, I. et al. Seminal plasma proteome: Promising biomarkers for bull fertility. *Agric. Res.*, v.1, p. 78 – 76, 2012.
- LARSON, B. L., SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma: I. Preliminary and electrophoretic studies. *J. Biol. Chem.*, v. 206, p. 741 – 749, 1954.
- LOGUE, D.; GREIG, A. Infertility in the bull, ram and boar 2: Infertility associated with normal service behavior. *In Practice*, v.8, n.3, p. 118 – 122, 1986.
- MANJUNATH, P; SARAM, M.R. Purification and biochemical characterization of the major acid proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.*, v.241, p. 685-692, 1987.
- MANJUNATH, P.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem.* v.267, p. 10149–10155, 1992.
- MARTINEZ, M. L.; VERNEQUE, R. S.; TEODORO, R. L. Correlações entre características da qualidade do sêmen e a circunferência escrotal de reprodutores da raça Gir. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29 n.3, p. 700-706, 2000.
- MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A.; HAVT, A. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Mol. Reprod and Develop.*, v.75, n.1, p.8-16, 2008.
- MILLER, D.J., WINER, A., AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.*, v.42, p.899-915, 1990.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A. et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J. of Androl.*, v.27, n.2, p.201-211, 2006.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H. et al. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J. of Androl.*, v.27, n.4, p. 534 – 541, 2006.
- MOURA, A.A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B. A. et al. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J. of Proteom.*, v. 73, p. 2006- 2020, 2010.
- MOURA, G.S. Estudo clínico - andrológico, e genético – molecular em touros da raça Gir – Leiteiro (*Bos taurus indicus*) no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013. 99p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 108p.

OLIVEIRA, L. Z.; DO CARMO, A. S.; LIMA, V.F. M. H. et al. Alta incidência de hipoplasia testicular em touros Brangus-Ibagé no estado do Mato Grosso do Sul: Relato de caso. *Ars Veterinária*, v.27, n.1, p. 51 – 55, 2011.

ONG, S. E.; PANDEY, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biom. Eng.*, v. 18, p. 195 – 205, 2001.

PEREIRA, E.; ELER, J. P. FERRAZ; J. B. S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. *Ver. bras. Zootec.*, v.29.n. 6, p. 1676 – 1683, 2000.

PRAGER, E.M., JOLLES, P. Animal lysozymes c and g: an overview. *Exs.* v..75, p. 9-31, 1995.

QUIRINO, C. R. Herdabilidades e correlações genéticas entre medições testiculares, características seminais e libido em touros Nelore. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 104p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária.

RÊGO, J. P. A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A. et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 148, p. 1 – 17, 2014.

RÊGO, J. P. A. Proteínas do plasma seminal e das células espermáticas de touros *Bos Indicus* das raças Brahman e Guzará associadas com parâmetros seminais. Fortaleza. Universidade Federal do Ceará, 2014. 267p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Departamento de Zootecnia.

REIS FILHO, J. C. Endogamia na raça Gir. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 2006. 49p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

ROCHA, M. C. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus normais e com alterações reprodutivas. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1972. 58 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C. et al.. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Comunicado Técnico* 136, Brasília – DF 12p.,2005.

ROMMELAERE, H.; VAN TROYS, M.; GAO, Y. et al. Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide 1 and seven related subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.90, p. 11975-11979, 1993.

RONCOLETTA, M. FRANCESCHINI, P. H. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. *Braz. J. vet.*, v. 36, n.2, p. 82 – 86, 1999.

ROUGH, S. R.; PARKS, J. E. Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Activity in Seminal Plasma from the Bull, Stallion, Rabbit, and Rooster. *Biol. of Reprod.*, v. 50, p. 912 – 916, 1994.

SALVADOR, D.F.; DIAS J.C.; VALE FILHO, V.R. *et al.* Perfil Andrológico de Touros da raça Nelore com três e quatro ano de idade, criados extensivamente em condições do estado do Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, n.2, p.64-65, 2002.

SALVADOR, D. F. Perfis cromatográficos e eletroforéticos de proteínas com afinidade a heparina do sêmen de touros jovens da raça Nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelamento do sêmen e reação acrossômica induzida (RAI). Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. 57 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, Ed. Escola de Veterinária, UFMG, 2002, 254p.

SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. *Patologia veterinária*. São Paulo: Roca, 2011, 904 p.

SAS. **SAS User`s guide**. Cary, NC: SAS Institute, 2002.

SKYDGEL, R. A.; DEDDISH, P. A.; DAVIS, R. M. Isolation and Characterization of a Basic Carboxypeptidase from Human Seminal Plasma. *Arch. of Biochem. and Biophysics*, v. 267, n. 2, p. 660-667, 1988.

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

SOUBEYRAND, S.; LAZURE C.; MANJUNATH, P. Phospholipase A2 from bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Biochem. J.* v. 329, p. 41 – 47, 1998.

THÉRIEN, I; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol. of Reprod.*; v.65, p. 41 – 51, 2001.

TRINDADE, J.B.C. Análise proteômica de isolados de Leishmania (*Leishmania chagasi*), sensíveis e resistentes a miltefosina. Vitória. Universidade Federal do Espírito Santo, 2011, 110p. Dissertação (Mestrado).

UNANIAN, M. M.; SILVA, A. E. D. F.; MCMANUS, C. *et al.* Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. *Ver. Bras. Zootec.*, v. 29, n.1, p. 136 – 144, 2000.

UREN, T. K. JOHANSEN, F. E., WIJBURG, O. L. C. *et al.* Role of the polymeric Ig in mucosal B cell homeostasis. *The J. of Immunol.*, v.170, p. 2531 – 2539, 2003.

VALE FILHO, V.R.; PINTO, P.A.; FONSECA, J. *et al.* *Patologia do sêmen: diagnóstico andrológico e classificação de Bos taurus e Bos indicus quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil - de um estudo de 1088 touros*. São Paulo: Dow Química, 1979. 54p.

VALE FILHO, V.R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 7, 1988. Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: CBRA, v.1, p. 418-438. 1988.

VALE FILHO, V. R. Subfertilidade em touros jovens e erados: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº35, p.81-87, 2001.

VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; AZEVEDO, N. A., Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução. In: VII SIMCORTE – Simpósio Nacional de Gado de Corte, 7, 2010, Viçosa, Anais. p. 363-412.

VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; SILVA, M. A. et al. Novos métodos de avaliação andrológica e do potencial reprodutivo de touros. In: V Simpósio Nacional sobre Produção e Gerenciamento da Pecuária de Corte, 5, 2012, Belo Horizonte, Anais. Belo Horizonte, FEPMVZ, p.179 – 239.

VALE FILHO, V.R.; MOURA, G.S.; ANDRADE, J.V. et al. Frequências da hipoplasia testicular e de outros distúrbios andrológicos em touros Gir-Leiteiro, criados em Minas Gerais. In: Anais XX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2013, Uberlândia. Anais. Belo Horizonte, 2013. p. 246

VAN TILBURG, M. F.; RODRIGUES, M. A. M.; MOREIRA, R. A. et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. *Theriogenology*, v.79, p. 1274 – 1261, 2013.

XU, K.; LING, M-T.; WANG, X. et al. Evidence of a novel biomarker, α 1-Casein, a milk protein, in benign prostate hyperplasia. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, v. 9, p. 293–297, 2006.

WELTER, B.M; JACOMINI, J.O. Proteínas do plasma seminal e sua relação com características espermáticas e nível sérico de testosterona em touros da raça Nelore. Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia, 2006. 34p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Faculdade de Medicina Veterinária.

8. ANEXOS

Identificação dos “spots” mais abundantes em animais hipoplásicos e em animais normais.

Identificação dos spots mais abundantes nos animais hipoplásicos

Spot	Protein name	NCBI accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z	z
1	Chain A, Bull Seminal Plasma Pdc-109 Fibronectin Type II Module (BSP1)	20663779	215	26	(69)CVFPFIYGGK ⁽⁷⁸⁾	5	1186.5914	2
					(69)CVFPFIYGGK ⁽⁷⁸⁾	30	1186.5914	2
					(69)CVFPFIYGGK ⁽⁷⁸⁾	12	1186.5916	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	15	2060.8934	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	66	2060.8968	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	70	2076.8916	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	73	2092.8840	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	86	2092.8870	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	69	2348.0062	3
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	47	2363.9983	3
(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	98	2364.0025	3					
2	seminal plasma protein BSP-30 kDa precursor	28849953	208	27	(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	22	977.4924	2
					(167)WCSLTSNYDR ⁽¹⁷⁶⁾	68	1300.5576	2
					(167)WCSLTSNYDRDK ⁽¹⁷⁸⁾	26	1543.6708	3
					(138)DEPECVFPIYR ⁽¹⁴⁹⁾	17	1570.7236	2
					(138)DEPECVFPIYR ⁽¹⁴⁹⁾	17	1570.7236	2
					(138)DEPECVFPIYR ⁽¹⁴⁹⁾	46	1570.7236	2
					(85)ANDLNAVFEQACAFPFYK ⁽¹⁰⁴⁾	46	2231.0552	2
3	PREDICTED: platelet-activating factor acetylhydrolase	555988954	386	26	(388)ASLAFLLQK ⁽³⁹⁵⁾	28	876.5108	2
					(102)EYFLGLSK ⁽¹⁰⁹⁾	31	955.5076	2
					(212)GEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	53	975.4726	2
					(365)IIGYLFLLK ⁽³⁷³⁾	21	1066.6482	2
					(211)RGEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	38	1131.5708	2
					(323)FQYPSNIIR ⁽³³¹⁾	40	1136.6026	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	17	1297.5350	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	10	1297.5370	2
					(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	14	1430.7634	2
					(311)IPQLFFINSER ⁽³²²⁾	65	1459.7904	2
	(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	29	1783.8535	3				
	(120)IMGLFFGSMTPAAWNAHLR ⁽¹³⁹⁾	49	2252.0944	3				
	seminal plasma protein BSP-30 kDa precursor	28849953	217	30	(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	22	977.4916	2
					(167)WCSLTSNYDR ⁽¹⁷⁶⁾	58	1300.5574	2
					(167)WCSLTSNYDR ⁽¹⁷⁶⁾	49	1300.5574	2
					(167)WCSLTSNYDRDK ⁽¹⁷⁸⁾	18	1543.6738	3
					(138)DEPECVFPIYR ⁽¹⁴⁹⁾	40	1570.7200	2
(85)ANDLNAVFEQACAFPFYK ⁽¹⁰⁴⁾					42	2231.0544	2	

					(133)FCTERDEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	37	2264.0074	3
4	PREDICTED: WAP four-disulfide core domain protein 2-like	594037564	200	49	(47)ACVLDEDCDDNLK ⁽⁵⁹⁾	84	1565.6428	2
					(47)ACVLDEDCDDNLK ⁽⁵⁹⁾	103	1565.6438	2
					(47)ACVLDEDCDDNLK ⁽⁵⁹⁾	96	1565.6442	2
					(94)DQCQVDSQCPDALK ⁽¹⁰⁷⁾	55	1662.7052	2
					(94)DQCQVDSQCPDALK ⁽¹⁰⁷⁾	30	1662.7056	2
					(94)DQCQVDSQCPDALK ⁽¹⁰⁷⁾	39	1662.7056	2
					(60)CCEAGCATVCQMPNDKPGSCPNDIAFPQLGLCR ⁽⁹³⁾	18	3881.6491	3
					(60)CCEAGCATVCQMPNDKPGSCPNDIAFPQLGLCR ⁽⁹³⁾	43	3897.6412	3
	seminal plasma protein BSP-30 kDa precursor	28849953	105	21	(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	22	977.4910	2
					(138)DEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	51	1570.7236	2
					(85)ANDLNAVFE GPACAFPFYK ⁽¹⁰⁴⁾	32	2231.0560	2
	PREDICTED: phospholipase B-like 1	634858243	50	1	(81)KPSMIDKVR ⁽⁸⁹⁾	50	1088.6254	2
5	Chain A, Bull Seminal Plasma Pdc-109 Fibronectin Type II Module	20663779	202	26	(69)CVFPFIYGGK ⁽⁷⁸⁾	8	1186.5896	2
					(69)CVFPFIYGGK ⁽⁷⁸⁾	26	1186.5896	2
					(69)CVFPFIYGGK ⁽⁷⁸⁾	31	1186.5942	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	21	2060.8946	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	78	2060.8956	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	24	2076.8882	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	66	2076.8904	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	27	2092.8854	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	85	2092.8882	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	26	2332.0147	3
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2348.0104	3
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2364.0046	3
	casein alphaS1	225632	70	10	(106)YLGYLEQLLR ⁽¹¹⁵⁾	39	1266.7074	2
	probable exonuclease mut-7 homolog	555993905	53	2	(38)FFVAPFPEVFGK ⁽⁴⁹⁾	31	1383.7302	2
					(218)LERLSPR ⁽²²⁴⁾	25	869.5368	2
					(846)FALALGSTPRAVR ⁽⁸⁵⁸⁾	28	1357.7006	2
6	seminal plasma protein BSP-30 kDa precursor	28849953	216	29	(85)ANDLNAVFE GPACAFPFYK ⁽¹⁰⁴⁾	50	2231.0594	2
					(133)FCTERDEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	6	2264.0071	3
					(138)DEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	46	1570.7238	2
					(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	32	977.4922	2
					(167)WCSLTSNYDR ⁽¹⁷⁶⁾	81	1300.5594	2
7	zinc-alpha-2-glycoprotein precursor	77735615	373	36	(64)RAEPLAPWSQVEGMEDWEK ⁽⁸²⁾	22	2273.0440	3
					(89)AREDIFMETLSDIMDYK ⁽¹⁰⁶⁾	46	2271.0130	3
					(109)EGSHTFQGAFGCELR ⁽¹²³⁾	20	1694.7484	3
					(144)FDKEIPAWVPLDPAAQNTK ⁽¹⁶²⁾	49	2139.1021	3
					(147)EIPAWVPLDPAAQNTK ⁽¹⁶²⁾	32	1748.9222	2

				(165)WEAEAVYVQR ⁽¹⁷⁴⁾	54	1249.6166	2
				(177)AYLEEECPGMLR ⁽¹⁸⁸⁾	73	1482.6556	2
				(177)AYLEEECPGMLR ⁽¹⁸⁸⁾	52	1482.6556	2
				(222)CLAYDFYPR ⁽²³⁰⁾	46	1203.5432	2
				(231)SIGLHWTR ⁽²³⁸⁾	30	968.5244	2
mesothelin precursor	154152139	51	7	(150)LSYFFLYVTPEDIHK ⁽¹⁶⁴⁾	8	1870.9534	2
				(274)IKPFLGGASTEDLR ⁽²⁸⁷⁾	43	1502.8096	3
PREDICTED: SLC2A4 regulator-like	655850626	50	3	(111)AVEASLPR ⁽¹¹⁸⁾	50	841.5078	2
8 clusterin preproprotein	27806907	456	16	(62)KLLSSLEEAK ⁽⁷²⁾	72	1229.7304	2
				(63)KLLSSLEEAK ⁽⁷²⁾	55	1101.6254	2
				(153)IDSLMENDR ⁽¹⁶¹⁾	71	1091.4992	2
				(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	33	2915.2237	4
				(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	49	2915.2325	4
				(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	39	2915.2469	4
				(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	24	2931.2293	4
				(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	36	2931.2357	4
				(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	47	1809.7684	3
				(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	30	1809.7708	3
				(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	32	1825.7635	3
				(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	35	1825.7659	3
				(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	25	1825.7766	2
				(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	63	1841.7568	3
				(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	34	1841.7586	3
				(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	52	1841.7662	2
				(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	75	1410.6508	2
				(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	14	1410.6508	2
				(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	65	1410.6508	2
				(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	63	1410.6524	2
				(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	88	1426.6434	2
				(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	89	1426.6484	2
				(193)RPQDTQYYSPFSSFPR ⁽²⁰⁸⁾	35	1974.9184	3
				(193)RPQDTQYYSPFSSFPR ⁽²⁰⁸⁾	32	1974.336	2
				(209)GSLFFNPK ⁽²¹⁶⁾	23	908.4772	2
spermadhesin-1 precursor	27807111	165	38	(36)EESGVIATYYGPK ⁽⁴⁸⁾	70	1412.6904	2
				(65)VSIQYLQLNCNK ⁽⁷⁶⁾	35	1478.7662	2
				(77)ESLEIIDGLPGSPVLGK ⁽⁹³⁾	45	1722.952	2
				(94)ICEGLMDYR ⁽⁹³⁾	16	1242.5456	2
seminal fluid protein A3 – bovine	89765	58	17	(29)CVFPFIYGK ⁽³⁸⁾	33	1243.6146	2
				(74)CVFPFIYEGK ⁽⁸³⁾	25	1258.6102	2
Tropomyosin alpha-1 chain	440901307	46	3	(265)YEEIKLLSGK ⁽²⁷⁴⁾	46	1178.6008	2

9	clusterin preproprotein	27806907	475	16	(62)KLLSSLEEAK ⁽⁷²⁾	67	1229.7302	2
					(63)KLLSSLEEAK ⁽⁷²⁾	52	1101.6348	2
					(153)IDSLMENDR ⁽¹⁶¹⁾	62	1091.4988	2
					(153)IDSLMENDR ⁽¹⁶¹⁾	48	1091.4994	2
					(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	9	2899.2513	4
					(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	44	2915.2373	4
					(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	74	2915.2401	4
					(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	36	2915.2417	4
					(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	13	2931.2289	4
					(153)IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	38	2931.2349	4
					(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	45	1809.7699	3
					(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	35	1825.7620	3
					(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	18	1825.7656	3
					(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	33	1841.7559	3
					(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	66	1841.7640	3
					(162)EQSHVMDVMEDSFTR ⁽¹⁷⁶⁾	43	1841.7720	2
					(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	28	1410.6518	2
					(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	79	1410.6518	2
					(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	34	1410.6528	2
					(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	80	1410.6554	2
					(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	88	1426.6446	2
					(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	55	1426.6470	2
					(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	82	1426.6470	2
(177)ASSIMDELFQDR ⁽¹⁸⁸⁾	81	1426.6476	2					
(193)RPQDTQYYSPFSSFPR ⁽²⁰⁸⁾	40	1974.9235	3					
(193)RPQDTQYYSPFSSFPR ⁽²⁰⁸⁾	38	1974.9432	2					
(209)GSLFFNPK ⁽²¹⁶⁾	25	908.4784	2					
10	PREDICTED: platelet-activating factor acetylhydrolase	555988954	845	41	(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	65	1414.7648	2
					(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	60	1430.7638	2
					(102)EYFLGLSK ⁽¹⁰⁹⁾	26	955.5052	2
					(102)EYFLGLSK ⁽¹⁰⁹⁾	9	955.5068	2
					(120)IMGLFFGSMTPAAWNAHLR ⁽¹³⁹⁾	68	2252.0980	3
					(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	70	1589.8771	3
					(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	75	1589.8846	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	29	1297.5346	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	59	1297.5360	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	16	1297.5382	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	54	1297.5382	2
					(211)RGEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	43	1131.5726	2

				(212)GEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	59	975.4706	2
				(268)IAIIGHSFGGATVIQTLSEDQR ⁽²⁸⁹⁾	68	2312.2183	3
				(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	66	2185.0154	2
				(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	44	2201.0086	2
				(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	115	2201.0086	2
				(311)IPQPLFFINSER ⁽³²²⁾	66	1459.7858	2
				(323)FQYPSNIIR ⁽³³¹⁾	40	1136.6050	2
				(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	50	1783.8574	2
				3490GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	31	1783.8577	2
				(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	54	1783.8646	2
				(365)IIGYLFLLK ⁽³⁷³⁾	28	1066.6458	2
				(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	43	1431.7324	2
				(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	54	1431.7354	2
				(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	28	1431.7358	2
				(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	7	1431.7438	2
				(388)ASLAFLQK ⁽³⁹⁵⁾	25	876.5076	2
				(67)LALLVDTVGPR ⁽⁷⁷⁾	70	1152.6942	2
				(116)GEESAVMLEPR ⁽¹²⁶⁾	40	1232.5780	2
				(138)GLETFSQLIWR ⁽¹⁴⁸⁾	68	1348.7228	2
				(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	65	1414.7630	2
				(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	49	1430.7284	2
				(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	61	1430.7672	2
				(102)EYFLGLSK ⁽¹⁰⁹⁾	32	955.5068	2
				(110)FLGTHWLVGK ⁽¹¹⁹⁾	37	1156.6378	2
				(110)FLGTHWLVGK ⁽¹¹⁹⁾	20	1156.6438	2
				(120)TMGLFFGSMITPAAWNAHLR ⁽¹³⁹⁾	17	2236.0921	3
				(120)TMGLFFGSMITPAAWNAHLR ⁽¹³⁹⁾	61	2252.0974	3
				(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	54	1589.8675	3
				(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	79	1589.8844	2
				(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	32	1297.5176	2
				(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	62	1297.5176	2
				(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	42	1297.5360	2
				(211)RGEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	32	1131.5740	2
				(212)GEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	59	975.4706	2
				(268)IAIIGHSFGGATVIQTLSEDQR ⁽²⁸⁹⁾	57	2312.2198	3
				(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	101	2185.0156	2
				(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	128	2201.0086	2
				(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	58	2201.0146	2
				(311)IPQPLFFINSER ⁽³²²⁾	63	1459.7614	2
				(311)IPQPLFFINSER ⁽³²²⁾	19	1459.788	2
				(323)FQYPSNIIR ⁽³³¹⁾	44	1136.5802	2
11	carboxypeptidase Q precursor	115495837	110	4			
	beta-hexosaminidase subunit alpha precursor	115495441	68	2			
	platelet-activating factor acetylhydrolase	555988954	930	43			

					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	50	1783.8514	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	44	1783.8577	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	11	1783.8601	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	88	1783.8690	2
					(365)IIGYLFTLK ⁽³⁷³⁾	28	1066.6264	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	15	1431.7248	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	18	1431.7256	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	55	1431.7298	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	47	1431.7312	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	6	1431.7440	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	23	1431.7484	2
					(388)ASLAFLQK ⁽³⁹⁵⁾	40	876.5044	2
12	platelet-activating factor acetylhydrolase	555988954	930	43	(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	65	1414.7630	2
					(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	49	1430.7284	2
					(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	61	1430.7672	2
					(102)EYFLGLSK ⁽¹⁰⁹⁾	32	955.5068	2
					(110)FLGTHWLVGK ⁽¹¹⁹⁾	37	1156.6378	2
					(110)FLGTHWLVGK ⁽¹¹⁹⁾	20	1156.6438	2
					(120)IMGLFFGSMTTPAAWNAHLR ⁽¹³⁹⁾	17	2236.0921	3
					(120)IMGLFFGSMTTPAAWNAHLR ⁽¹³⁹⁾	61	2252.0974	3
					(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	54	1589.8675	3
					(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	79	1589.8844	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	32	1297.5176	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	62	1297.5176	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	42	1297.5360	2
					(211)RGEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	32	1131.5740	2
					(212)GEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	59	975.4706	2
					(268)IAIIGHSFGGATVIQTLSEDQR ⁽²⁸⁹⁾	57	2312.2198	3
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	101	2185.0156	2
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	128	2201.0086	2
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	58	2201.0146	2
					(311)IPQPLFFINSER ⁽³²²⁾	63	1459.7614	2
					(311)IPQPLFFINSER ⁽³²²⁾	19	1459.788	2
					(323)FQYPSNIIR ⁽³³¹⁾	44	1136.5802	2
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	50	1783.8514	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	44	1783.8577	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	11	1783.8601	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	88	1783.8690	2
					(365)IIGYLFTLK ⁽³⁷³⁾	28	1066.6264	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	15	1431.7248	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	18	1431.7256	2

	T-complex protein 1 subunit theta	75812922	404	17	(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	55	1431.7298	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	47	1431.7312	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	6	1431.7440	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	23	1431.7484	2
					(388)ASLAFQK ⁽³⁹⁵⁾	40	876.5044	2
					(63)LFVTNDAATILR ⁽⁷⁴⁾	74	1332.7454	2
					(239)IAVYSCPFDGMITETK ⁽²⁵⁴⁾	21	1830.8686	2
					(282)AIADTGANVVVTGGR ⁽²⁹⁶⁾	89	1399.7480	2
					(368)EDGAISTIVLR ⁽³⁷⁸⁾	58	1172.6498	2
					(379)GSTDNLMDIER ⁽³⁹⁰⁾	20	1380.6356	2
					(391)AVDDGVNTFK ⁽⁴⁰⁰⁾	7	1064.5182	2
					(441)FAEAFEIPR ⁽⁴⁵⁰⁾	63	1149.5908	2
					(510)LATNAAVTVLR ⁽⁵²⁰⁾	71	1127.6704	2
13	PREDICTED: platelet-activating factor acetylhydrolase	555988954	910	43	(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	61	1430.7654	2
					(102)EYFLGLSK ⁽¹⁰⁹⁾	17	955.5062	2
					(110)FLGTHWLVGK ⁽¹¹⁹⁾	37	1156.6426	2
					(120)IMGLFFGSMTPAAWNAHLR ⁽¹³⁹⁾	68	2252.0956	3
					(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	50	1589.8807	3
					(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	75	1589.8850	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	26	1297.5256	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	59	1297.5256	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	29	1297.5354	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	59	1297.5374	2
					(211)RGEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	35	1131.5722	2
					(212)GEEEFPLR ⁽²¹⁹⁾	59	975.4702	2
					(268)IAIIGHSFGGATVIQTLSEDQR ⁽²⁸⁹⁾	63	2312.2174	3
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	79	2185.0118	2
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	44	2200.9981	3
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	115	2201.0076	2
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	82	2201.0100	2
					(311)IPQPLFFINSER ⁽³²²⁾	68	1459.7678	2
					(311)IPQPLFFINSER ⁽³²²⁾	18	1459.7922	2
					(323)FQYPSNIIR ⁽³³¹⁾	47	1136.5822	2
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	33	1783.8550	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	34	1783.8580	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	50	1783.8598	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	76	1783.8668	2
					(365)IIGYLFLLK ⁽³⁷³⁾	29	1066.6322	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	15	1431.7250	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	15	1431.7284	2

					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	20	1431.7304	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	85	1431.7306	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	8	1431.7308	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	54	1431.7312	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	20	1431.7442	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	16	1431.7450	2
					(388)ASLAFQK ⁽³⁹⁵⁾	16	876.5016	2
	PREDICTED: SLC2A4 regulator-like	655850626	53	3	(111)AVEASLPR ⁽¹¹⁸⁾	53	841.5058	2
14	Full=Cathepsin L2; Flags: Precursor	75060921	195	10	(39)LYGMNEEEWR ⁽⁴⁸⁾	46	1325.5822	2
					(39)LYGMNEEEWR ⁽⁴⁸⁾	62	1341.5746	2
					(158)LVSLSEQNLVDCSR ⁽¹⁷¹⁾	93	1618.8080	2
					(262)SGIYYDPDCSSK ⁽²⁷³⁾	40	1390.5794	2
	platelet-activating factor acetylhydrolase precursor	99028959	55	3	(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	55	1431.7294	2
15	PREDICTED: platelet-activating factor acetylhydrolase	555988954	910	43	(42)IQALMAAANIGQSK ⁽⁵⁵⁾	61	1430.7654	2
					(102)EYFLGLSK ⁽¹⁰⁹⁾	17	955.5062	2
					(110)FLGTHWLVGK ⁽¹¹⁹⁾	37	1156.6426	2
					(120)IMGLFFGSMTPAAWNAHLR ⁽¹³⁹⁾	68	2252.0956	3
					(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	50	1589.8807	3
					(144)YPLIIFSHGLGAFR ⁽¹⁵⁷⁾	75	1589.8850	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	26	1297.5256	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	59	1297.5256	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	29	1297.5354	2
					(181)DGSACSTYYFK ⁽¹⁹¹⁾	59	1297.5374	2
					(211)RGEFFPLR ⁽²¹⁹⁾	35	1131.5722	2
					(212)GEEFFPLR ⁽²¹⁹⁾	59	975.4702	2
					(268)IAIIGHSFGGATVIQTLSEDQR ⁽²⁸⁹⁾	63	2312.2174	3
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	79	2185.0118	2
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	44	2200.9981	3
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	115	2201.0076	2
					(292)CGIALDAWMFPVGDEVYSR ⁽³¹⁰⁾	82	2201.0100	2
					(311)IPQPLFFINER ⁽³²²⁾	68	1459.7678	2
					(311)IPQPLFFINER ⁽³²²⁾	18	1459.7922	2
					(323)FQYPSNIIR ⁽³³¹⁾	47	1136.5822	2
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	33	1783.8550	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	34	1783.8580	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	50	1783.8598	3
					(349)GSVHQNFVDFTFATSK ⁽³⁶⁴⁾	76	1783.8668	2
					(365)IIGYLFTLK ⁽³⁷³⁾	29	1066.6322	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	15	1431.7250	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	15	1431.7284	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	20	1431.7304	2

					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	85	1431.7306	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	8	1431.7308	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	54	1431.7312	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	20	1431.7442	2
					(374)GDIDSNVAISLSNK ⁽³⁸⁷⁾	16	1431.7450	2
					(388)ASLAFQK ⁽³⁹⁵⁾	16	876.5016	2
					(371)TMLDDMR ⁽³⁷⁷⁾	54	912.4062	2
	PREDICTED: secernin-3 isoform X1	344268354	54	1				
16	beta-glucuronidase precursor	134085842	414	14	(41)ELDGLWSFR ⁽⁴⁹⁾	51	1121.5570	2
					(58)QGFEQQWYR ⁽⁶⁶⁾	38	1240.5696	2
					(95)SFVGWVWYER ⁽¹⁰⁴⁾	48	1327.6432	2
					(112)WTEDLGTR ⁽¹¹⁹⁾	50	976.4686	2
					(206)FDFFNAGLHR ⁽²¹⁶⁾	54	1385.6548	3
					(206)FDFFNAGLHR ⁽²¹⁶⁾	47	1385.6598	2
					(307)LTAQTAVGPVSDFYTLPGIR ⁽³²⁷⁾	25	2204.1892	3
					(307)LTAQTAVGPVSDFYTLPGIR ⁽³²⁷⁾	70	2204.2032	2
					(360)GFDWPLLK ⁽³⁶⁸⁾	19	1073.5996	2
					(375)WLGANAFR ⁽³⁸²⁾	47	933.4862	2
					(617)SAAFLLR ⁽⁶²³⁾	38	776.4578	2
	RecName: Full=Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	110825733	256	9	(150)FLGSGGFIGYAPNLSK ⁽¹⁶⁵⁾	45	1626.8502	2
					(205)IFQNLGDALDEVVLK ⁽²¹⁹⁾	20	1672.9164	2
					(247)LQLNYLGNYPYR ⁽²⁵⁸⁾	80	1462.8030	2
					(430)SEDYVDIVQGR ⁽⁴⁴⁰⁾	58	1279.6100	2
					(614)FLVEYIAPMTEK ⁽⁶²⁵⁾	52	1455.7436	2
	Bovine Lactoferrin	504	47	1	(306)VDSALYLGR ⁽³¹⁵⁾	47	1079.5642	2
	RecName: Full=Polymeric immunoglobulin receptor	3914346	51	1	(363)GGSVTVSCPYNPK ⁽³⁷⁵⁾	51	1364.6456	2
17	beta-glucuronidase precursor	134085842	414	14	(41)ELDGLWSFR ⁽⁴⁹⁾	51	1121.5570	2
					(58)QGFEQQWYR ⁽⁶⁶⁾	38	1240.5696	2
					(95)SFVGWVWYER ⁽¹⁰⁴⁾	48	1327.6432	2
					(112)WTEDLGTR ⁽¹¹⁹⁾	50	976.4686	2
					(206)FDFFNAGLHR ⁽²¹⁶⁾	54	1385.6548	3
					(206)FDFFNAGLHR ⁽²¹⁶⁾	47	1385.6598	2
					(307)LTAQTAVGPVSDFYTLPGIR ⁽³²⁷⁾	25	2204.1892	3
					(307)LTAQTAVGPVSDFYTLPGIR ⁽³²⁷⁾	70	2204.2032	2
					(360)GFDWPLLK ⁽³⁶⁸⁾	19	1073.5996	2
					(375)WLGANAFR ⁽³⁸²⁾	47	933.4862	2
					(617)SAAFLLR ⁽⁶²³⁾	38	776.4578	2
	RecName: Full=Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	110825733	256	9	(150)FLGSGGFIGYAPNLSK ⁽¹⁶⁵⁾	45	1626.8502	2
					(205)IFQNLGDALDEVVLK ⁽²¹⁹⁾	20	1672.9164	2
					(247)LQLNYLGNYPYR ⁽²⁵⁸⁾	80	1462.8030	2
					(430)SEDYVDIVQGR ⁽⁴⁴⁰⁾	58	1279.6100	2
					(614)FLVEYIAPMTEK ⁽⁶²⁵⁾	52	1455.7436	2

	RecName: Full=Polymeric immunoglobulin receptor lactoferrin, partial	3914346 100172966	51 59	1 5	(363)GGSVTVSCPYNPK ⁽³⁷⁵⁾ (48)LGAPSITCVR ⁽⁵⁷⁾ (333)VDSALYLGSR ⁽³⁴²⁾	51 23 36	1364.6456 1072.5722 1079.5680	2 2 2
18	RecName: Full=Cathepsin L2; Flags: Precursor	75060921	501	35	(38)RLYGMNEEEWR ⁽⁴⁸⁾ (39)LYGMNEEEWR ⁽⁴⁸⁾ (57)KIIDLHNQEYSEGK ⁽⁷⁰⁾ (58)IIDLHNQEYSEGK ⁽⁷⁰⁾ (58)IIDLHNQEYSEGK ⁽⁷⁰⁾ (75)MAMNAFGDMTNEEFR ⁽⁸⁹⁾ (75)MAMNAFGDMTNEEFR ⁽⁸⁹⁾ (75)MAMNAFGDMTNEEFR ⁽⁸⁹⁾ (75)MAMNAFGDMTNEEFR ⁽⁸⁹⁾ (105)LFHEPLLVDVPK ⁽¹¹⁶⁾ (105)LFHEPLLVDVPK ⁽¹¹⁶⁾ (158)LVSLSEQNLVDCSR ⁽¹⁷¹⁾ (262)SGIYYDPDCSSK ⁽²⁷³⁾ (262)SGIYYDPDCSSK ⁽²⁷³⁾ (274)DLDHGVLVVG YGFEGTDSNNNK ⁽²⁹⁵⁾ (274)DLDHGVLVVG YGFEGTDSNNNK ⁽²⁹⁵⁾ (274)DLDHGVLVVG YGFEGTDSNNNK ⁽²⁹⁵⁾ (318)DQNNHCGIATAASYPTV ⁽³³⁴⁾ (207)GSIYSLNEGYAK ⁽²¹⁸⁾ (219)DFDPALTEYVQR ⁽²³⁰⁾ (256)TLVYGGIFMYPANK ⁽²⁶⁹⁾ (256)TLVYGGIFMYPANK ⁽²⁶⁹⁾ (278)LLYECNPMAYVIEK ⁽²⁹¹⁾	19 69 14 20 61 68 81 47 93 27 38 93 30 41 53 53 28 21 57 87 35 54 50	1497.6757 1341.5742 1672.8469 1544.7475 1544.7566 1778.7144 1794.7150 1794.7152 1810.7102 1405.7980 1405.8048 1618.8074 1390.5814 1390.5830 2349.0919 2349.0943 2349.0967 1817.810 1300.6366 1452.6976 1572.8172 1588.8114 1757.8504	3 2 3 3 2 2 2 2 2 3 2 2 2 2 3 3 3 2 2 2 2 2 2
	fructose-1,6-bisphosphatase 1	77735849	248	15				

19	alpha-enolase	87196501	692	31	(16)GNPTVEVDLFTAK ⁽²⁸⁾	75	1389.7196	2				
					(16)GNPTVEVDLFTAK ⁽²⁸⁾	62	1389.7212	2				
					(16)GNPTVEVDLFTAK ⁽²⁸⁾	58	1389.7214	2				
					(16)GNPTVEVDLFTAK ⁽²⁸⁾	58	1389.7214	2				
					(33)AAVPSGASTGIYEALRL ⁽⁵⁰⁾	128	1803.9518	2				
					(93)LMIEDMGTENK ⁽¹⁰³⁾	47	1279.5850	2				
					(93)LMIEDMGTENK ⁽¹⁰³⁾	22	1295.5826	2				
					(163)LAMQEFMILPVGAEFR ⁽¹⁷⁹⁾	17	1980.9922	3				
					(163)LAMQEFMILPVGAEFR ⁽¹⁷⁹⁾	42	1980.9960	2				
					(163)LAMQEFMILPVGAEFR ⁽¹⁷⁹⁾	41	1980.9974	2				
					(163)LAMQEFMILPVGAEFR ⁽¹⁷⁹⁾	113	1996.9940	2				
					(184)IGAENVYHNLK ⁽¹⁹³⁾	37	1142.6140	2				
					(203)DATNVGDEGGFAPNILENK ⁽²²¹⁾	55	1959.9296	2				
					(240)VVIGMDVAASEFYR ⁽²⁵³⁾	86	1555.7824	2				
					(240)VVIGMDVAASEFYR ⁽²⁵³⁾	88	1571.7714	2				
					(240)VVIGMDVAASEFYR ⁽²⁵³⁾	89	1571.7782	2				
					(270)YITPDELANLYK ⁽²⁸¹⁾	35	1438.7418	2				
					(270)YITPDELANLYK ⁽²⁸¹⁾	34	1438.7434	2				
					(336)SCNCLLLK ⁽³⁴³⁾	16	1006.4982	2				
					cathepsin D precursor	262073106	232	18	(344)VNQIGSVTESLQACK ⁽³⁵⁸⁾	97	1632.8224	2
(183)QPGVVFIAAK ⁽¹⁹²⁾	21	1028.5960	2									
(193)FDGILGMAYPR ⁽²⁰³⁾	53	1254.6118	2									
(225)NVFSFFLNR ⁽²³³⁾	45	1142.5936	2									
(237)AOPGGELMLGGTDSK ⁽²⁵¹⁾	8	1475.7028	2									
(330)VSSLPQVTVK ⁽³³⁹⁾	40	1056.6218	2									
(344)DYALSPEDYALK ⁽³⁵⁵⁾	22	1383.6614	2									
(391)YYTVFDR ⁽³⁹⁷⁾	45	962.4526	2									
20	complement factor H precursor	76677897	714	14					(58)TLGSIVMMCR ⁽⁶⁷⁾	23	1182.5626	2
									(237)CAAGFEYGQR ⁽²⁴⁶⁾	70	1157.4994	2
					(272)IPNGVYRPELSK ⁽²⁸³⁾	34	1371.7552	3				
					(297)GFFPEIR ⁽³⁰³⁾	46	864.4526	2				
					(312)DGWVPVPR ⁽³¹⁹⁾	28	924.4878	2				
					(453)IENGFLSESTFTYPLNK ⁽⁴⁶⁹⁾	81	1958.9790	2				
					(486)TSGLITCLK ⁽⁴⁹⁴⁾	30	991.5414	2				
					(530)LDYECVDGYENR ⁽⁵⁴¹⁾	95	1531.6346	2				
					(545)TTGSIVCGQDGWSDK ⁽⁵⁵⁹⁾	71	1609.7134	2				
					(566)ECSIPEMDPYLNAYPR ⁽⁵⁸¹⁾	54	1969.8638	2				
					(646)EEYAHNEVVEYACNPR ⁽⁶⁶¹⁾	21	1978.8502	3				
					(720)EAFTMIGPR ⁽⁷²⁸⁾	34	1036.5062	2				
					(841)ENYLIQDAEEIVCK ⁽⁸⁵⁴⁾	63	1722.8256	2				
					(1026)CLSYQQLDGSNTIQCICK ⁽¹⁰⁴²⁾	19	2061.9584	2				

					(1145)CQAYYELR ⁽¹¹⁵²⁾	45	1101.4970	2
	G-protein coupled receptor 35	444722840	46	1	(1)MGFPELR ⁽⁷⁾	46	864.4526	2
21	complement factor B precursor	95147674	383	8	(78)STGSWSTLQTQDR ⁽⁹⁰⁾	87	1465.6846	2
					(131)CYDGYTLR ⁽¹³⁸⁾	38	1046.4556	2
					(358)ALLEVYNMMSR ⁽³⁶⁸⁾	20	1357.6444	2
					(407)YLLDIGR ⁽⁴¹³⁾	46	848.4784	2
					(568)GIPEFYDYDVALVR ⁽⁵⁸¹⁾	81	1655.8298	2
					(627)DIEALFVSESK ⁽⁶³⁷⁾	14	1236.6202	2
					(627)DIEALFVSESK ⁽⁶³⁷⁾	55	1236.6294	2
					(627)DIEALFVSESKK ⁽⁶³⁸⁾	57	1364.725	2
22	complement factor B precursor	95147674	383	8	(78)STGSWSTLQTQDR ⁽⁹⁰⁾	87	1465.6846	2
					(131)CYDGYTLR ⁽¹³⁸⁾	38	1046.4556	2
					(358)ALLEVYNMMSR ⁽³⁶⁸⁾	20	1357.6444	2
					(407)YLLDIGR ⁽⁴¹³⁾	46	848.4784	2
					(568)GIPEFYDYDVALVR ⁽⁵⁸¹⁾	81	1655.8298	2
					(627)DIEALFVSESK ⁽⁶³⁷⁾	14	1236.6202	2
					(627)DIEALFVSESK ⁽⁶³⁷⁾	55	1236.6294	2
					(627)DIEALFVSESKK ⁽⁶³⁸⁾	57	1364.725	2
23	complement factor B precursor	95147674	383	8	(78)STGSWSTLQTQDR ⁽⁹⁰⁾	87	1465.6846	2
					(131)CYDGYTLR ⁽¹³⁸⁾	38	1046.4556	2
					(358)ALLEVYNMMSR ⁽³⁶⁸⁾	20	1357.6444	2
					(407)YLLDIGR ⁽⁴¹³⁾	46	848.4784	2
					(568)GIPEFYDYDVALVR ⁽⁵⁸¹⁾	81	1655.8298	2
					(627)DIEALFVSESK ⁽⁶³⁷⁾	14	1236.6202	2
					(627)DIEALFVSESK ⁽⁶³⁷⁾	55	1236.6294	2
					(627)DIEALFVSESKK ⁽⁶³⁸⁾	57	1364.725	2
24	PREDICTED: epididymal-specific lipocalin-5-like	555949868	279	40	(59)VGAVIVEQDGPLSLTSVSDHMNLCKM ⁽⁸⁵⁾	22	2968.4113	4
					(99)FKIPLESGGK ⁽¹⁰⁸⁾	51	1074.6080	2
					(99)FKIPLESGGK ⁽¹⁰⁸⁾	19	1074.6118	2
					(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.6184	2
					(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.6188	2
					(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	38	1135.6190	2
					(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.6192	2
					(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	61	1135.6232	2
					(119)TYAIMNIIILNR ⁽¹²⁹⁾	6	1320.7306	2
					(119)TYAIMNIIILNR ⁽¹²⁹⁾	55	1320.7306	2
					(119)TYAIMNIIILNR ⁽¹²⁹⁾	36	1336.7198	2
					(119)TYAIMNIIILNR ⁽¹²⁹⁾	59	1336.7198	2
	Tropomyosin alpha-1 chain	440901307	46	3	(158)AVEQGLSVSNVQLLTK ⁽¹⁷³⁾	83	1684.9490	2
					(265)YEEIKLLSGK ⁽²⁷⁴⁾	46	1178.5996	2
25	PREDICTED: epididymal-specific lipocalin-5-like	555949868	327	41	(58)KVGAVIVEQDGPLSLTSVSDHMNLCKM ⁽⁸⁵⁾	16	3096.5249	4

				(59)VGAVIVEQDGPLSLTSDHMLCMK ⁽⁸⁵⁾	36	2968.4157	4
				(59)VGAVIVEQDGPLSLTSDHMLCMK ⁽⁸⁵⁾	7	2968.4209	4
				(99)FKIPLES ⁽¹⁰⁹⁾ GK	50	1074.5950	2
				(99)FKIPLES ⁽¹⁰⁹⁾ GK	46	1074.6122	2
				(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.5930	2
				(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.6094	2
				(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.6138	2
				(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	45	1135.6180	2
				(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.6196	2
				(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.6196	2
				(109)EVIVVATDYK ⁽¹¹⁸⁾	63	1135.6200	2
				(119)TYAIMN ⁽¹²⁹⁾ ILNR	16	1320.7282	2
				(119)TYAIMN ⁽¹²⁹⁾ ILNR	36	1320.7300	2
				(119)TYAIMN ⁽¹²⁹⁾ ILNR	76	1320.7304	2
				(119)TYAIMN ⁽¹²⁹⁾ ILNR	32	1336.7106	2
				(119)TYAIMN ⁽¹²⁹⁾ ILNR	63	1336.7106	2
				(158)AVEQGLSVSNVQLLTK ⁽¹⁷³⁾	19	1684.9446	2
				(158)AVEQGLSVSNVQLLTK ⁽¹⁷³⁾	86	1684.9446	2
				(41)ISSYSSWEPK ⁽⁵⁰⁾	59	1182.5588	2
				(51)CTWTILLER ⁽⁵⁹⁾	56	1190.6160	2
				(94)FCSSGGHLVFR ⁽¹⁰³⁾	65	1178.5642	3
				(116)SSNQPVSSFDIFY ⁽¹³⁴⁾ GRPSA	61	2120.9968	2
				(119)ETDGMN ⁽¹³⁰⁾ YWQGWK	31	1513.6384	2
				(119)ETDGMN ⁽¹³⁰⁾ YWQGWK	54	1529.6360	2
TPA: bodhesin-4-like	296472572	241	35				
lysozyme-like protein 1 precursor	118150928	54	8				
PREDICTED: secernin-3 isoform X1	344268354	47	1	(371)TMLDDMR.K ⁽³⁷⁷⁾	47	912.4020	2

26	seminal plasma protein BSP-30 kDa precursor	28849953	415	41	(85)ANDLNAVFE GPACAFPFTYK ⁽¹⁰⁴⁾	59	2231.0440	2
					(85)ANDLNAVFE GPACAFPFTYK ⁽¹⁰⁴⁾	21	2231.0462	2
					(85)ANDLNAVFE GPACAFPFTYK ⁽¹⁰⁴⁾	33	2231.0528	2
					(114)KNSVLLWCSLDTEYQGNWK ⁽¹³²⁾	35	2340.1093	3
					(114)KNSVLLWCSLDTEYQGNWK ⁽¹³²⁾	57	2340.1240	3
					(114)KNSVLLWCSLDTEYQGNWK ⁽¹³²⁾	26	2340.1356	2
					(133)FCTERDEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	61	2263.9321	3
					(133)FCTERDEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	65	2264.0196	2
					(138)DEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	43	1570.6192	2
					(138)DEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	33	1570.6192	2
					(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	32	977.4486	2
					(149)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	21	977.4578	2
					(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	20	977.4624	2
					(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	20	977.4892	2
					(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	23	977.4900	2
					(166)RWCSLTSNYDR ⁽¹⁷⁶⁾	32	1456.6564	3
					(166)RWCSLTSNYDR ⁽¹⁷⁶⁾	57	1456.6626	2
					(167)WCSLTSNYDR ⁽¹⁷⁶⁾	21	1300.5578	2
					(167)WCSLTSNYDRDK ⁽¹⁷⁸⁾	48	1543.6516	3
					(167)WCSLTSNYDRDK ⁽¹⁷⁸⁾	81	1543.6806	2
nerve growth factor, partial	163420	116	20	(80)HWNSYCTTTHTFVK ⁽⁹³⁾	32	1780.7971	3	
				(109)IDTACVCVLSR ⁽¹¹⁹⁾	84	1292.6288	2	

Identificação dos spots mais abundantes nos animais normais

Spot	Protein name	NCBI accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z	z
27	seminal plasma protein BSP-30 kDa precursor	28849953	399	40	(85)ANDLNAVFEGPACAFPFTYK ⁽¹⁰⁴⁾	63	2231.0472	2
					(85)ANDLNAVFEGPACAFPFTYK ⁽¹⁰⁴⁾	27	2231.0514	2
					(114)KNSVLLWCSLDTEYQGNWK ⁽¹³²⁾	57	2340.1222	3
					(114)KNSVLLWCSLDTEYQGNWK ⁽¹³²⁾	21	2340.1246	3
					(115)NSVLLWCSLDTEYQGNWK ⁽¹³²⁾	54	2212.0406	2
					(115)NSVLLWCSLDTEYQGNWK ⁽¹³²⁾	17	2212.0452	2
					(133)FCTERDEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	32	2264.0101	3
					(138)DEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	49	1570.7204	2
					(138)DEPECVFPFIYR ⁽¹⁴⁹⁾	46	1570.7230	2
					(159)VHSFFWR ⁽¹⁶⁵⁾	32	977.4916	2
(167)WCSLTSNYDR ⁽¹⁷⁶⁾	76	1300.5564	2					
(167)WCSLTSNYDRDK ⁽¹⁷⁸⁾	36	1543.6741	3					
28	galectin-3-binding protein precursor	114052595	288	12	(163)VREEDEIAMCAHK ⁽¹⁷³⁾	27	1586.7172	3
					(174)LILSTNPEAHGLWK ⁽¹⁸⁷⁾	8	1577.8585	3
					(216)RIDVSLSSVK ⁽²²⁵⁾	62	1102.6406	2
					(217)IDVSLSSVK ⁽²²⁵⁾	44	946.5378	2
					(408)LYTSPTWSQSVMSSSYNPSR ⁽⁴²⁷⁾	76	2293.0506	2
					(525)STSLFPCPSGVFSR ⁽⁵³⁸⁾	71	1540.7424	2
					(371)TMLDDMR ⁽³⁷⁷⁾	46	896.4114	2
					(371)TMLDDMR ⁽³⁷⁷⁾	47	912.4046	2
					(371)TMLDDMR ⁽³⁷⁷⁾	25	912.4058	2
					(217)IDVSLSSVK ⁽²²⁵⁾	55	946.5380	2
29	galectin-3-binding protein precursor	114052595	192	7	(408)LYTSPTWSQSVMSSSYNPSR ⁽⁴²⁷⁾	88	2293.0482	2
					(525)STSLFPCPSGVFSR ⁽⁵³⁸⁾	49	1540.7444	2
					(177)ASSIMDELQDR ⁽¹⁸⁸⁾	76	1426.6454	2
					(35)HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR ⁽⁵⁷⁾	72	2738.1961	4
					(35)HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR ⁽⁵⁷⁾	60	2738.2057	4
					(35)HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR ⁽⁵⁷⁾	13	2738.2075	3
					(69)CVFPFIYGGK ⁽⁷⁸⁾	30	1186.5900	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	58	2060.8944	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	33	2076.8872	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDK ⁽¹⁰²⁾	80	2092.8890	2
30	Chain A, Bull Seminal Plasma Pdc-109 Fibronectin Type Ii Module	20663779	268	47	(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	13	2347.9954	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	81	2348.0050	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	66	2348.0083	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2364.0031	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2364.0031	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2364.0031	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2364.0031	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2364.0031	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2364.0031	2
					(86)IGSMWMSWCSLSPNYDKDR ⁽¹⁰⁴⁾	86	2364.0031	2
30	PREDICTED: secernin-3 isoform X1	344268354	47	1	(371)TMLDDMR ⁽³⁷⁷⁾	46	896.4114	2
					(371)TMLDDMR ⁽³⁷⁷⁾	47	912.4046	2
					(371)TMLDDMR ⁽³⁷⁷⁾	25	912.4058	2
					(217)IDVSLSSVK ⁽²²⁵⁾	55	946.5380	2
					(408)LYTSPTWSQSVMSSSYNPSR ⁽⁴²⁷⁾	88	2293.0482	2
					(525)STSLFPCPSGVFSR ⁽⁵³⁸⁾	49	1540.7444	2
					(177)ASSIMDELQDR ⁽¹⁸⁸⁾	76	1426.6454	2
					(35)HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR ⁽⁵⁷⁾	72	2738.1961	4
					(35)HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR ⁽⁵⁷⁾	60	2738.2057	4
					(35)HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR ⁽⁵⁷⁾	13	2738.2075	3

	PREDICTED: phospholipase B-like 1	634858243	47	1	(81)KPSMIDKVR ⁽⁸⁹⁾	47	1088.6302	2
31	seminal fluid protein A3 – bovine	89765	65	17	(29)CVFPIYGNK ⁽³⁸⁾	32	1243.6124	2
					(74)CVFPIYEGK ⁽⁸³⁾	33	1258.6148	2
	spermadhesin-1 precursor	27807111	60	9	(36)EESGVIATYYGPK ⁽⁴⁸⁾	60	1412.6258	2
	Tropomyosin alpha-1 chain	440901307	46	3	(265)YEEIKLLSGK ⁽²⁷⁴⁾	46	1178.5988	2
32	beta-hexosaminidase subunit beta preproprotein	270483766	322	13	(67)AGPSCAVLQEA ⁽⁷⁹⁾	109	1404.6922	2
					(81)YYDYIFGFYK ⁽⁹⁰⁾	17	1377.6362	2
					(135)GPVATLTANR ⁽¹⁴⁴⁾	9	998.5556	2
					(238)GSYSLSHVYTPNDV ⁽²⁵²⁾	56	1693.8085	3
					(382)SIVWQEVYDDEGK ⁽³⁹⁴⁾	74	1566.7264	2
					(395)LLPGTVVQVWK ⁽⁴⁰⁵⁾	57	1238.7460	2
	RecName: Full=Serotransferrin	2501351	110	2	(48)ILES ⁽⁵⁹⁾	70	1334.6964	2
					(540)YYGYTGAF ⁽⁵⁴⁸⁾	40	1096.5034	2
	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial precursor	27806417	72	1	(540)ISSLYGDLR ⁽⁵⁴⁸⁾	72	1022.5456	2
	Albumin	229552	70	2	(42)LVNELTEFAK ⁽⁵¹⁾	46	1162.6300	2
					(137)YLYEIAR ⁽¹⁴³⁾	24	926.4912	2
33	inhibitor of carbonic anhydrase precursor	114053269	331	14	(27)WCTVSNLEASK ⁽³⁷⁾	82	1293.6056	2
					(62)TSYLDCIR ⁽⁶⁹⁾	58	1026.4862	2
					(123)GSNFQLNQLQGK ⁽¹³⁴⁾	28	1332.6876	2
					(153)MLLPSDWSQEAAK ⁽¹⁶⁶⁾	22	1561.7550	2
					(202)EPYFGYSGAFK ⁽²¹²⁾	21	1264.5828	2
					(213)CLQDGVGDV ⁽²²⁵⁾	18	1450.6946	2
					(367)GYVVAVVK ⁽³⁷⁵⁾	18	996.5712	2
					(593)YLGPEYLQAIANVK ⁽⁶⁰⁶⁾	84	1577.8570	2