

CAMILO JOSÉ RAMÍREZ LÓPEZ

**ANÁLISE PROTEÔMICA E BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL DE
TOUROS DA RAÇA NELORE CLASSIFICADOS COMO APTOS E INAPTOS À
REPRODUÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R173a
2018

Ramírez López, Camilo José, 1990-
Análise proteômica e bioquímica do plasma seminal de
touro da raça Nelore classificados como aptos e inaptos à
reprodução / Camilo José Ramírez López. – Viçosa, MG, 2018.
xiii, 112 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 48-69.

1. Bovinos - Reprodução. 2. Sêmen - Análise.
3. Espectrometria de massa. 4. Proteínas. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

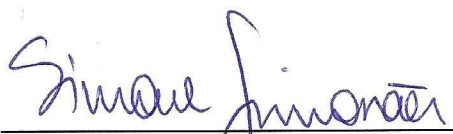
CDD 22. ed. 636.082

CAMILO JOSE RAMIREZ LOPEZ

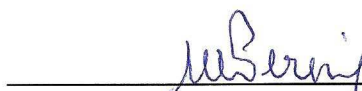
**ANÁLISE PROTEÔMICA E BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL DE
TOUROS DA RAÇA NELORE CLASSIFICADOS COMO APTOS E
INAPTOS À REPRODUÇÃO**

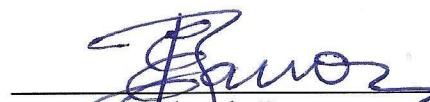
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

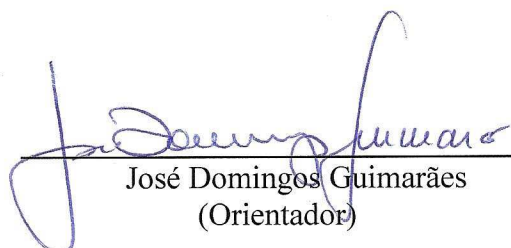
APROVADA: 30 de novembro de 2018.


Simone Eliza Facioni Guimarães


Mariana Machado Neves


Maria Cristina Baracat Pereira


Edvaldo Barros


José Domingos Guimarães
(Orientador)

DEDICATÓRIA

A Deus, à minha família, a meus mestres,
aos amigos e a todas as pessoas que
contribuírem para tornar este
logro uma realidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos pelo caminho certo e por colocar grandes pessoas na minha vida.

À minha mãe Zoila e minhas irmãs Milena e Luisa, pelo amor e apoio que nunca me negaram, mesmo nas situações mais difíceis. Obrigado por ajudar-me a tornar o homem que hoje sou.

Ao meu orientador José Domingos Guimarães, pela oportunidade, paciência e, sobretudo, pela amizade verdadeira, a ele meu eterno agradecimento.

À minha coorientadora, professora Maria Cristina, por ter me acolhido e aberto as portas de seu laboratório, e por toda sua orientação durante todo este processo.

Ao meu amigo Edvaldo Barros por sua dedicação e disponibilidade para tornar nossa obra ainda melhor.

À Agropecuária CFM LTDA, por ter disponibilizado os animais para este estudo.

À BIOCLIN QUIBASA, por doar os kits para as análises bioquímicas.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas pela disponibilidade das facilidades para execução deste trabalho.

A todos meus colegas de equipe e aos integrantes do laboratório de Proteômica e Bioquímica das Proteínas, vocês tornaram mais agradável meu trabalho.

À Juliana Rodrigues, Victor Gomez, Faider Castaño, Roman Maza David Contreras e Hernando Ospino, meus grandes amigos, obrigado pelos bons momentos e grandes lembranças.

Aos órgãos de fomentos CAPES, FAPEMIG, CNPq e FINEP, pelo apoio financeiro fundamental durante tudo este processo.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pelo, o financiamento das análises por LC-MS/MS

À Rosineia Cunha, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária por ser nosso anjo-da-guarda aqui na UFV.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade de seguir crescendo em níveis pessoal e profissional.

Por todo o carinho, paciência, disposição e apoio, muito obrigado a todos.

BIOGRAFIA

CAMILO JOSÉ RAMÍREZ LÓPEZ, filho de Camilo José Ramírez Vilaro e Zoila Rosa López Benítez, nasceu em 24 de julho de 1990 em Ayapel – Córdoba, Colômbia.

Graduou-se em Medicina Veterinária e Zootecnia em dezembro de 2014 pela Universidade de Córdoba, Colômbia, e em agosto de 2016 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG, Brasil.

SUMÁRIO

	Paginas
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	3
3.1. Plasma seminal	3
3.2. Perfil bioquímico do plasma seminal	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Aspectos éticos	11
4.2. Local do experimento e animais	11
4.3. Avaliação andrológica	11
4.4. Preparação do plasma seminal	12
4.5. Determinação dos componentes bioquímicos do plasma seminal	12
4.6. Extração e quantificação de proteínas solúveis	13
4.7. Processamento das proteínas do plasma seminal	13
4.7.1. Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE)	13
4.7.2. Short-run	14
4.7.3. Eletroforese bidimensional (SDS-PAGE 2-DE)	14
4.7.4. Digestão de proteínas em gel	15
4.8. Espectrometria de massas	16
4.8.1. LC-MS/MS	16
4.8.2. MALDI TOF/TOF	17
4.8.3. Identificação das proteínas	17
4.8.4. Classificação funcional das proteínas	18
4.8.5. Análise quantitativa das proteínas identificadas	18

4.8.6. Análise das redes de interação das proteínas	19
4.8.7. Analise Estatístico	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO 1	70
ANEXO 2	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
Asp	Aspecto do ejaculado
BSA	Bovine Serum Albumin
BSP	Binder Seminal Protein
Ca	Cálcio
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
Cl	Cloreto
CLU	Clusterin
Col	Colesterol
DTT	Ditiotreitol
Fe	Ferro
Gli	Glicose
HDL	Hight Denside Lipoprotein
K	Potássio
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massa
LDL	Light Density Lipoprotein
M	Molar
MALDI	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
Mg	Magnésio
Mgf	Mascot Generic Format
mM	Milimolar
MORF	Morfologia espermática
MOT	Motilidade espermática
Na	Sódio
OPN	Osteopontin
P	Fósforo
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PE	Perímetro Escrotal
PS	Plasma Seminal
PT	Proteínas Totais
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SPH	Spermadhesin
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	Time of Fly
Tri	Triglicerídeos
TUB	Turbilhonamento
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Pressão
VIG	Vigor espermático
Vol	Volume do ejaculado

LISTA DE TABELAS

	Pag
Tabela 1 - Valores médios, máximos e mínimos do perímetro escrotal e características físicas e morfológicas dos espermatozoides de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução.	20
Tabela 2 - Perfil protéico-energético do plasma seminal de touros da raça Nelore, 19,8 a 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução.	23
Tabela 3 - Perfil mineral do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 a 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução.	24
Tabela 4 - Correlações simples de Pearson das características bioquímicas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade classificados como aptos e inaptos à reprodução.	26
Tabela 5 - Proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos à reprodução, separadas por eletroforese bidimensional e identificadas por MALDI TOF/TOF.	29
Tabela 6 - BLASTp das proteínas do plasma seminal bovino identificadas no banco de dados UniProt KB como não caracterizadas.	37
Tabela 7 - Proteínas diferencialmente abundantes em plasma seminal de touros da raça Nelore, classificados como aptos e inaptos à reprodução.	38

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Representação esquemática do sistema reprodutor do touro, ilustrando as fontes e fluxo do plasma seminal.	4
Figura 2. Mecanismo de interação entre a gema do ovo e o leite com as Binder Seminal Protein.	6
Figura 3. Papel do estresse oxidativo e das espécies reativas de oxigênio na fisiologia reprodutiva masculina.	9
Figura 4. Perfil proteômico bidimensional do plasma seminal de touros da raça Nelore entre 19,8 a 22,7 meses de idade, classificados como aptos (A1-A3) e inaptos à reprodução (B1-B3).	28
Figura 5. Mapa bidimensional dos spots do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 a 22,7 meses de idade. (A) representa o gel com os spots protéicos gerado pelas análises no Image Master III para o grupo de touros aptos à reprodução e (B) representa os spots identificados por MALDI TOF/TOF.	31
Figura 6. Classificação funcional das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução.	34
Figura 7. Classificação funcional das proteínas do plasma seminal de acordo com seus processos biológicos, anotadas no UniprotKB, de touros da raça Nelore entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução.	35
Figura 8. Classificação das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução, enquadradas no sub-processo Cellula Process.	35
Figura 9. HeatMap das proteínas diferencialmente abundantes do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade classificados como aptos e inapto à reprodução	43
Figura 10. Redes de interação das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade classificados como aptos e inaptos à reprodução, obtidas por meio do Software STRING 10.5	46

RESUMO

LÓPEZ, Camilo José Ramírez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2018. **Análise proteômica e bioquímica do plasma seminal de touros da raça Nelore classificados como aptos e inaptos à reprodução.** Orientador: José Domingos Guimarães.

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar o perfil proteômico e bioquímico do plasma seminal de touros jovens da raça Nelore e sua relação com as características físicas e morfológicas do sêmen. Foram usados 20 touros com idades compreendidas entre 19,8 e 22,7 meses. Todos os touros foram submetidos à avaliação andrológicas e classificados segundo suas características reprodutivas em touros aptos e inaptos à reprodução. Foi coletada uma amostra de sêmen de cada touro pelo método de eletroejaculação e foram avaliados os aspectos físicos e morfológicos dos ejaculados por meio de microscopia óptica convencional e de contraste de fase. Depois das análises, os ejaculados foram centrifugados e os sobrenadantes (plasma seminal) foram usados para determinar as concentrações de glicose, albumina, proteínas totais, triglicerídeos, colesterol, HDL, LDL, ureia, cálcio, fósforo, cloreto, ferro, sódio e potássio por meio de um analisador bioquímico e fotometria de chama. Depois da centrifugação, as proteínas do plasma seminal foram quantificadas pelo método de Bradford e analisadas por meio de eletroforeses monodimensional e bidimensional e espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF e LC-MS/MS). As proteínas foram identificadas pelo MASCOT e validadas estatisticamente usando o software SCAFFOLD Q+. As proteínas foram caracterizadas de acordo a suas classes e processos biológicos pelo PANTHER usando os termos de ontologia gênica depositados no banco de dados UniprotKB. As proteínas diferencialmente abundantes foram quantificadas pelo método emPAI considerando unicamente aquelas proteínas com foldchange superior a 1,5 vezes. As redes de interação entre as proteínas identificadas no plasma seminal foram obtidas por meio do STRING. Os dados foram analisados pelo software estatístico SAEG - UFV, e foram usadas as correlações de Pearson para estudar a correlação entre as características estudadas. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nos valores médios das características do aspecto físico do sêmen e perímetro escrotal entre os grupos de animais. A porcentagem de defeitos espermáticos apresentou diferença ($p < 0,05$) entre os dois grupos de touros sendo maior no grupo de reprodutores classificados como inaptos à reprodução. Também foram observadas diferenças nas concentrações de colesterol, triglicerídeos e ferro ($p < 0,05$), sendo maiores para os animais classificados como aptos à reprodução. Foram observadas correlações médias, positivas e negativas, entre os componentes do perfil bioquímico do plasma seminal. Usando LC-MS/MS foram identificadas 298 proteínas com pelo menos dois peptídeos

validados. A Spermahesin 1 foi a proteína mais abundante representando 39,6 % do total das proteínas identificadas no plasma seminal, seguida pela BSP PDC-109 (4,6 %) e Serine protease inhibitor clade E member 2 (4,0 %). De acordo com a classificação dos processos biológicos, 94 proteínas apresentaram atividade relacionadas com processos celulares, 85 com processos metabólicos e 39 com resposta a estímulos, sendo as categorias com maior número de proteínas classificadas. As proteínas do plasma seminal foram categorizadas em 21 classes de proteínas diferentes, em que a classe das hidrolases (49) e modulares enzimáticos (29) foram os grupos com maior número de proteínas enquadradas. Das 298 proteínas identificadas, 34 foram diferencialmente abundantes, e delas 26 apresentaram mais abundantes no grupo de touros classificados como aptos à reprodução e 8 no grupo de touros classificados inaptos à reprodução.

ABSTRACT

LÓPEZ, Camilo José Ramírez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2018
Proteomic and biochemical analysis of seminal plasma of Nelore bulls classified as fit and unfit for breeding. Adviser: José Domingos Guimarães.

This study was carried out as the objective of determining the proteomic and biochemical profile of the seminal plasma of young bulls of the Nelore breed and its relation with the physical and morphological characteristics of the semen. Twenty bulls were used between 19.8 and 22.7 months. All bulls were submitted to andrological evaluation and classified according to their reproductive characteristics in bulls fit and unfit for breeding. A semen sample was collected from each bull by the electroejaculation method and the physical and morphological aspects of the ejaculate were evaluated by means of conventional optical and phase contrast microscopy. After the analyzes, the ejaculates were centrifuged and the supernatants (seminal plasma) were used to determine the concentrations of glucose, albumin, total proteins, triglycerides, cholesterol, HLD, LDL, urea, calcium, phosphorus, chloride, iron, sodium and potassium by means of a biochemical analyzer and flame photometry. After centrifugation, seminal plasma proteins were quantified by the Bradford method and analyzed by electrophoresis (SDS-PAGE and 2-D SDS-PAGE) and mass spectrometry (MALDI TOF / TOF and LC-MS / MS). The proteins were identified by MASCOT and statistically validated using SCAFFOLD Q + software. Proteins were classified according to their classes and biological processes by the PANTHER using the terms of gene ontology deposited in the database UniprotKB. Differentially abundant proteins were quantified by the ipPA method considering only those proteins with foldchange greater than 1.5 times. The interaction networks between the proteins identified in the seminal plasma were obtained through STRING (version 10.5). The data were analyzed by the statistical software SAEG - UFV, and the Pearson correlations were used to study the correlation between the characteristics studied. No differences ($p > 0.05$) were observed in the mean values of the physical appearance characteristics of the semen and scrotal circumference among the groups of animals. The percentage of sperm defects presented a difference ($p < 0.05$) between the two groups of bulls being higher in the group of reproducers classified as unfit for reproduction. Differences in cholesterol, triglyceride and iron concentrations ($p < 0.05$) were also observed, being higher for the animals classified as suitable for reproduction. Mean, positive and negative correlations were observed between the components of the biochemical profile of the seminal plasma. Using LC-MS / MS, 298 proteins with at least two validated peptides were identified. Spermahesin 1 was the most abundant

protein representing 39.6% of the total proteins identified in seminal plasma, followed by BSP PDC-109 (4.6%) and Serine protease inhibitor clade E member 2 (4.0%). According to the classification of the biological processes, 94 proteins showed activity with cellular processes, 85 with metabolic processes and 39 with response to stimuli, being the categories with the highest number of proteins classified. Seminal plasma proteins were categorized into 21 classes of different proteins, where class hydroxylase (49) and enzymatic modulators (29) were the groups with the highest number of framed proteins. Of the 298 proteins identified, 34 were differentially abundant, of which 26 were more abundant in the group of bulls classified as fit for breeding and 8 in the group of bulls classified as being unfit for breeding.

1. INTRODUÇÃO

O exame andrológico é um procedimento fundamental para avaliação dos fatores que influenciam a função reprodutiva dos touros ao relacionar aspectos clínicos gerais com o exame dos órgãos genitais, aspectos físicos do sêmen e morfologia espermática (Karunakaran e Devanathan, 2017). Porém, parâmetros como a motilidade espermática progressiva retilínea e morfologia espermática apresentam limitada correlação com os índices de fertilidade in vivo, provavelmente por existir alterações espermáticas moleculares não perceptíveis pelas análises convencionais (Camargo et al., 2018).

A capacidade fecundante da célula espermática depende de fatores intrínsecos como a integridade da cromatina, a qualidade do genoma, a estrutura e a composição da membrana, além da presença de certos componentes bioquímicos do plasma seminal, como proteínas, açúcares e minerais, que contribuem para que os espermatozoides exerçam com eficiência suas funções (De Assumpção et al., 2013).

O plasma seminal é uma mistura complexa de secreções de origens testiculares, epididimárias e das glândulas sexuais acessórias, rico em variedade de proteínas que influenciam no metabolismo, motilidade e propriedades da membrana modulando a capacidade fecundante dos gametas masculinos (Somashekar et al., 2017; Velho et al., 2018).

Diante disso, numerosos estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de identificar marcadores moleculares dos processos reprodutivos em animais de produção, como a identificação de proteínas de membranas e da célula como um todo, além das proteínas presentes nos fluidos reprodutivos (Kasvandik et al., 2015; Harayama et al., 2017).

Todas estas linhas de estudo pressupõem a hipótese de que componentes moleculares dos espermatozoides, ou dos meios que os cercam, influenciam a capacidade fecundante destas células. As diferenças de fertilidade observadas entre os animais, não explicadas pelos testes convencionais para avaliação da qualidade do sêmen, se relacionam com tais componentes, podendo assim ser identificados pelos testes complementares, tais como estudo proteômico, bioquímico ou genômico (Moura e Memili, 2016).

A identificação e quantificação abrangente de várias proteínas encontradas no plasma seminal oferecem informações importantes sobre a dinâmica das funções e diferenciação celular. Portanto o objetivo do presente estudo foi determinar o perfil proteômico do plasma seminal de touros jovens da raça Nelore classificados como aptos e inaptos à reprodução e sua correlação com as características físicas do sêmen e a morfologia espermática.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Determinar o perfil proteômico e bioquímico do plasma seminal de touros jovens da raça Nelore classificados como aptos e inaptos à reprodução e sua correlação com as características físicas do sêmen e morfologia espermática.

2.2. Objetivos Específicos:

Determinar o perfil proteômico do plasma seminal bovino por meio de duas abordagens proteômica diferentes;

Identificar possíveis alvos moleculares associados com touros da raça Nelore classificados como aptos e inaptos à reprodução;

Determinar as concentrações dos componentes bioquímicos orgânicos e inorgânicos do plasma seminal de touros da raça Nelore aptos e inaptos à reprodução e sua correlação com as características físicas do ejaculado e morfologia espermática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

3.1. Plasma seminal:

A reprodução é o começo da vida e uma necessidade para garantir a sobrevivência das espécies. Nos mamíferos, a reprodução sexuada implica a interação e fusão de um gameta masculino com um gameta feminino. Embora pareça simples, a reprodução sexuada envolve uma série complexa de passos de maturação bem organizados para ambos os gametas, que envolve muitos fatores externos (Plante et al., 2016). Depois da sua produção nos testículos, sua maturação nos epidídimos e a ejaculação, os espermatozoides entram em contato com um líquido chamado plasma seminal (Agarwal et al., 2016).

O plasma seminal (PS) é um fluido biológico complexo de caráter isotônico composto por múltiplas secreções dos testículos, epidídimos e das glândulas sexuais acessórias do macho, que se misturam com os espermatozoides durante o processo de ejaculação, aumentando o volume do ejaculado e facilitando a passagem dos gametas masculinos pelos órgãos reprodutivos (Figura 1) (Moura et al., 2006; Soleilhavoup et al., 2014; Westfalewicz et al., 2017). Além disso, o PS contém proteínas, enzimas, lipídios, ácidos orgânicos, minerais e outros componentes que desempenham papel importante na regulação das funções do sêmen (Ledesma et al., 2014). Dentre estes componentes, as proteínas presentes no PS possuem papel fundamental ao atuarem no remodelamento das membranas durante a maturação espermática, proporcionando proteção contra o estresse oxidativo e agindo como fatores decapacitantes ao serem absorvidas na superfície do espermatozoide logo após a ejaculação, mantendo a estabilidade da membrana até que aconteça o processo de capacitação nos órgãos genitais da fêmea, quando então, estas são removidas como pré-requisito para a fertilização (Rêgo et al., 2014).

As proteínas Binder Sperm Protein (BSP) secretadas pelas vesículas seminais pertencem à família das proteínas de ligação a heparina e representam aproximadamente 70 % dos componentes proteicos total do PS bovino. As proteínas mais comuns do PS bovino estão representadas por três proteínas ácidas, designadas como BSP-A1/A2, A3 e BSP 30. As BSP A1/A2 e A3 têm peso molecular de 15-16 kDa, enquanto que a BSP-30 tem de 28-30 kDa (Manjunath et al., 2002).

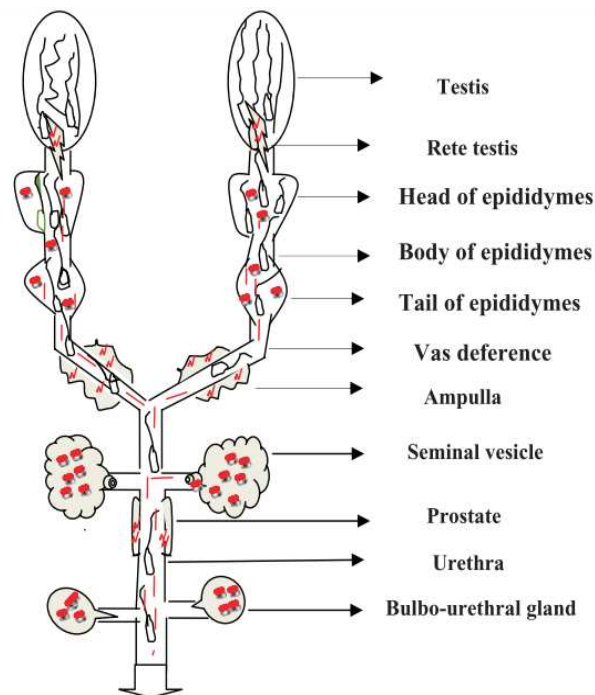


Figura 1: Representação esquemática do sistema reprodutor do touro, ilustrando as fontes e fluxo do plasma seminal. Fonte: Juyena e Stelletta (2012).

A BSP-A1/A2 também conhecida como PDC-109 é uma mistura de BSP-A1 e BSP-A2, que se diferenciam somente na glicosilação. Na ejaculação, os espermatozoides se misturam com PS durante um período curto de tempo e durante esta exposição, as BSP integram parcialmente o colesterol da membrana espermática (5 a 8 %). As BPS também se ligam aos fosfatidilcolina da membrana plasmática do espermatozoide evitando o livre movimento dos fosfolipídios, com conseguinte estabilização da membrana (Kurma et al., 2012).

À medida que os espermatozoides chegam a tuba uterina, as BSP ligadas aos espermatozoides interagem com fatores de capacitação, como lipoproteínas de alta densidade (HDL) e heparina, por meio de forças eletrostáticas geradas entre as cargas positivas dos aminoácidos da proteína e as carga negativa dos glicosaminoglicanos, potencializando a capacitação espermática mediante a estimulação do colesterol e o fluxo de fosfolipídios na membrana do espermatozoide (Guasti et al., 2012; Plante et al., 2016).

As BSPs também participam na reserva de espermatozoides na tuba uterina ao permitir que os gametas masculinos se unam com o epitélio das tubas uterinas. Esta união mantém estável a motilidade dos espermatozoides até que o ovócito atinja o sitio de fertilização (Gwanthmey et al., 2006; Apichela et al., 2014).

Normalmente, as BSP não estimulam o fluxo de lipídios durante a capacitação, a menos que estejam presentes certos agentes capacitantes, como LDL e heparina. Nesse caso, o epitélio dos ovidutos por meio das BSP estabilizam os espermatozoides até que os agentes capacitantes ingressem à área de armazenamento para iniciar a capacitação. Durante a capacitação, os espermatozoides perdem sua ligação com as BSP, o que leva a perda da afinidade de união com o epitélio dos ovidutos. Portanto, a perda das BSP durante a capacitação desempenha papel importante na liberação dos espermatozoides do reservatório nos ovidutos, sendo crucial na fertilização ao manter a motilidade das células espermáticas (Plante e Manjunath, 2015).

Todas as BSP têm em comum uma estrutura conservada por diversos N-terminais em sua composição e no comprimento, seguidos de dois domínios de fibronectina tipo II, dispostos em tandem (Fn2-A e Fn2-B) separados por um conector de sete resíduos de aminoácidos. Os domínios de fibronectina atuam como unidades funcionais para as proteínas. Algumas BSP também possuem um domínio curto e C-terminal (Manjunath et al., 2009; Plante et al., 2016).

O papel das BSP na criopreservação dos espermatozoides ainda não está totalmente elucidado. Estudos mostram que a exposição prolongada dos espermatozoides às BSP ou a uma concentração mais alta, leva mudanças na membrana plasmática dos espermatozoides, estimulando o fluxo da saída de colesterol. Este fluxo de lipídios ocasionado pelas BSP é dependente do tempo e da concentração, o que resulta numa desestabilização da membrana seguida de uma lesão criogênica manifestada por capacitação e reação acrossômica prematura (Srivastava et al., 2013).

Depois do conhecimento do efeito prejudicial das BSP nos espermatozoides criopreservados, alguns autores (Manjunath et al., 2007; Lusignan et al., 2011) demonstraram o efeito benéfico da inclusão da gema de ovo e o leite nos meios de criopreservação ao sequestrar as BSP por meio das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema do ovo e a caseína e α -lactoalbumina do leite, melhorando a motilidade espermática, viabilidade e integridade do acrossôma (Figura 2).

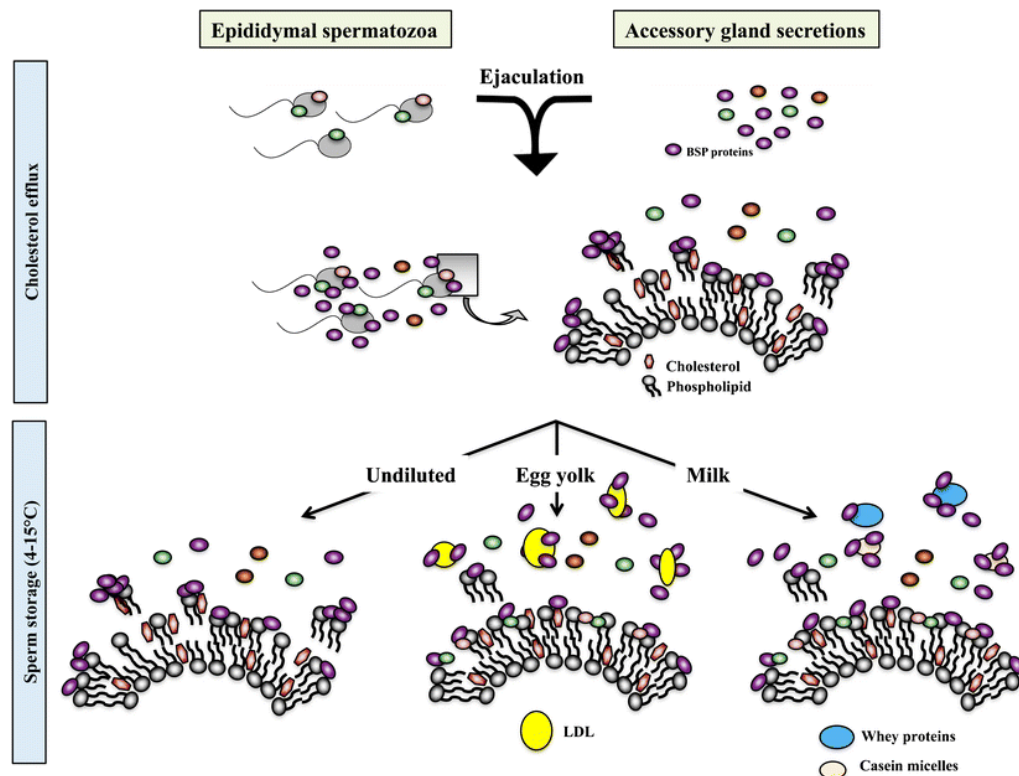


Figura 2: Mecanismo de interação entre a gema do ovo e o leite com as Binder Seminal Protein.
 Fonte: Plante et al., 2016.

As spermadecinas (SPH) são uma família de proteínas presente no plasma seminal que se encontram principalmente em ungulados, com abundância alta em porcos e javalis, onde representam aproximadamente o 75 % das proteínas plasmáticas seminais (Schröter et al., 2017). Em bovinos, são o segundo grupo mais abundante e sua presença tem sido relacionada com a inibição do estresse oxidativo e a redução da peroxidação lipídica das células espermáticas (Codognoto et al., 2018). As SPH são proteínas multifuncionais que exibem ampla de capacidade de união, se ligando a carboidratos, glicosaminoglicanos sulfatados, fosfolipídios e inibidores de proteases. Isto sugere que podem participar em diferentes etapas da fertilização (Töpfer et al., 1998). Durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo, tem sido demonstrada uma união forte das SPH à superfície dos espermatozoides mediante a interação com os fosfolipídios da bicamada da membrana (Calvete et al., 1996). Na ejaculação, estas proteínas formam uma capa protetora ao redor da região do acrossôma do espermatozoide, o que possivelmente evita reação acrossômica prematura (Kraus et al., 2005).

A clusterina (CLU) é uma das principais glicoproteínas presentes nos espermatozoides dos mamíferos e desempenha papel importante durante a maturação espermática (Menezes et al., 2017). Esta glicoproteína é sintetizada e secretada por uma ampla variedade de tecidos e

células em diferentes espécies e nos órgãos reprodutores masculinos, é produzida nos testículos, epidídimos e vesículas seminais (Salehi et al., 2013). A CLU apresentou correlações positivas entre a motilidade espermática e o vigor espermático, assim como com a integridade do acrossoma em sêmen fresco e criopreservados, ao aglutinar espermatozoides anormais (Menezes et al., 2017). Esta proteína integra o complexo de defesa das células ao atuar como chaperona, solubilizando proteínas parcialmente desestruturadas e reduzindo a citotoxicidade da precipitação proteica induzida pelo estresse celular. A CLU também possui o papel de inibir a lise pelo sistema do complemento presente nos epidídimos e nas secreções uterinas, o que garante maior viabilidade dos espermatozoides durante o trânsito nos órgãos reprodutores feminino (Rêgo et al., 2014).

A osteopontina (OPN) é uma fosfoproteína da matriz extracelular secretada e identificada em vários tecidos e fluidos, incluídos os órgãos reprodutores masculino e feminino. A OPN foi identificada previamente como um marcador de alta fertilidade de 55 kDa no plasma seminal de touros da raça Holandês, produzida pelas ampolas e as glândulas vesiculares (Erikson et al., 2007). A OPN participa na adesão celular, na remodelação tecidual e extracelular, a inflamação e os eventos mediados pelo sistema imunológico (Boulefour et al., 2016). Alguns autores sugerem que a OPN se une aos espermatozoides durante a ejaculação por meio das integrinas e o complexo integrina-OPN interage com a zona pelúcida (D'Cruz, 1996). Este modelo está respaldado pelo fato de que o fluido dos ovidutos bovino contém OPN. Além disso, a OPN se liga ao receptor CD44, que geralmente participa na adesão celular, e tem sido expressado tanto nos espermatozoides, quanto na membrana dos ovócitos (Souza et al., 2008).

No touro, a OPN se liga membrana do acrossoma durante a ejaculação e essa união persiste ainda depois que os espermatozoides entram em contato com as secreções do fluido dos ovidutos e in vitro quando sofrem reação acrossômica. Além da ligação espermática, a OPN interage com a zona pelúcida e o oolema dos ovócitos bovinos (Moura e Memili, 2016).

Além das propriedades anteriores, o PS proporciona proteção aos espermatozoides contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) produto do estresse oxidativo por meio de uma variedade de sistemas antioxidante que compreendem moléculas não enzimáticas (vitamina A, C, E, glutathione e albumina) e enzimáticas, que incluem a superóxido desmutase (SOD), glutathione peroxidase (GXP), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT) (Macanovic et al., 2015; Palani, 2018). Estas enzimas são expressas constitutivamente no sêmen de muitos mamíferos e captam os radicais livres protegendo a membrana dos espermatozoides contra a peroxidação lipídica, preservando sua integridade, e portanto, mantendo os parâmetros normais

de motilidade e morfologia espermática (Bansal e Bilaspuri, 2011; Shiva et al., 2011; Ahmadi et al., 2016; Patricio et al., 2016).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia em que participam radicais livres que, uma vez iniciada, pode produzir danos oxidativos os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da membrana dos espermatozoides (Hampel et al., 2017). A ação dos radicais livres sobre os PUFA diminuem a fluidez da membrana e altera a capacidade de intercâmbio iônico das células ao desativar os canais de íons da membrana plasmática. Estas mudanças aumentam a permeabilidade dos espermatozoides e reduzem a motilidade espermática e a fertilidade dos espermatozoides, além, de torná-los mais susceptíveis a mudanças de temperaturas (Stramová et al., 2014; Wagner et al., 2018)

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as atividades de captação de antioxidantes no sêmen. As ROS são agentes oxidantes altamente reativos que pertencem à classe de radicais livres que contém um ou mais elétrons não pareados essas moléculas estão em constante produção por meio dos processos metabólicos e fisiopatológicos. Diferentemente de outras células, os espermatozoides são mais vulneráveis ao estresse oxidativo porque sua membrana plasmática é rica em ácidos graxos poli-insaturados (Kefer et al., 2009; Atig et al., 2017).

Os espermatozoides dependem da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e da glicólise na cabeça e na peça intermediária para obter energia. A fosforilação oxidativa acopla-se com a cadeia respiratória (transporte de elétrons), um processo acompanhado pela geração de espécies reativas de oxigênio (Roychoudhury et al., 2016). As ROS são produtos naturais do metabolismo celular que, em quantidades fisiológicas são essenciais para os processos fisiológicos dos espermatozoides, como a capacitação, a hiperativação e a reação acrossômica que conduzem a uma fertilização bem-sucedida (Agarwal et al., 2014a).

As ROS observadas no plasma seminal são originárias de várias fontes endógenas e exógenas. O ejaculado consiste em diferentes tipos de células, incluindo células maduras e imaturas, leucócitos e células epiteliais. Nestas, os leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, e espermatozoides imaturos são considerados as principais fontes endógenas de ROS, enquanto vários fatores ambientais como radiação e toxinas podem contribuir para ROS exógenas (Figura 3; Agarwal et al., 2014b).

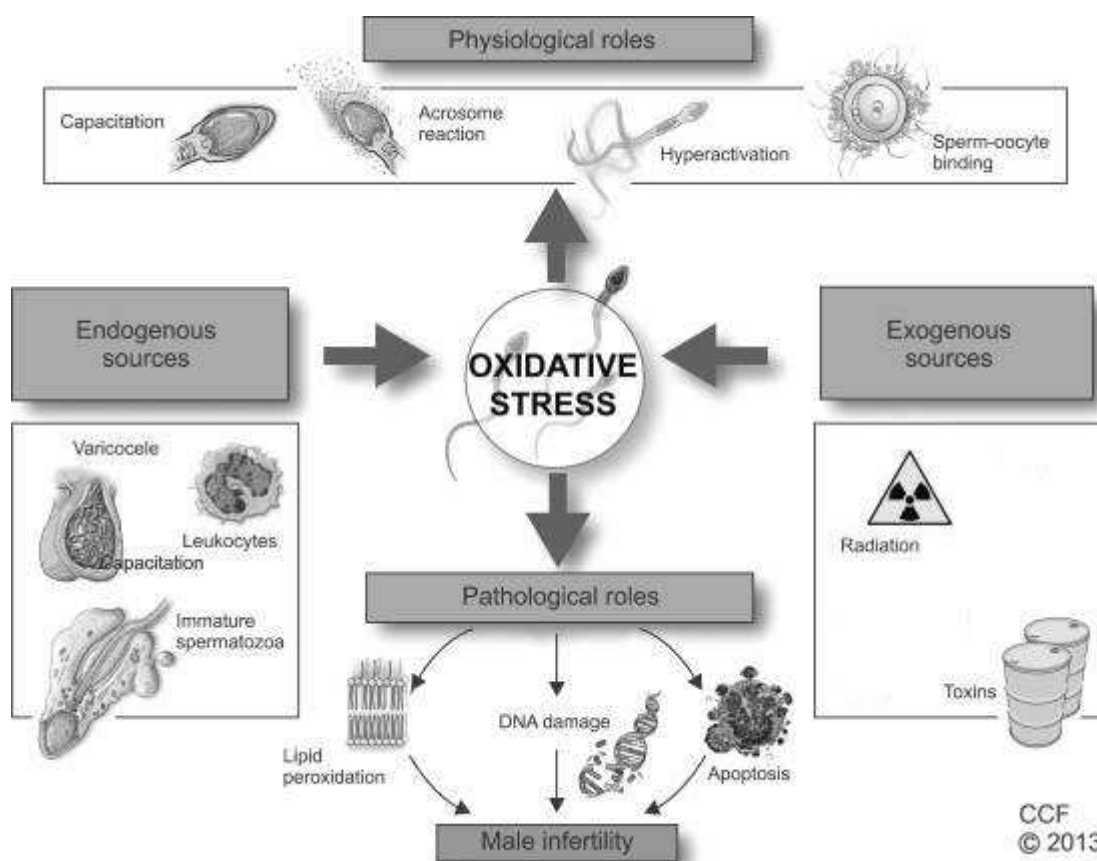


Figura 3. Papel do estresse oxidativo e das espécies reativas de oxigênio na fisiologia reprodutiva masculina. Fonte: Agarwal et al. (2104b), modificado.

3.3. Perfil bioquímico do plasma seminal:

O plasma seminal é muito importante para o metabolismo, função, sobrevivência e transporte dos espermatozoides (Samanta et al., 2018). Cátions como sódio, potássio, cálcio e magnésio no plasma seminal estabilizam o balanço osmótico das células espermáticas, enquanto, oligoelementos como cobre, zinco e ferro são componentes importantes de muitas enzimas envolvidas na fisiologia reprodutiva masculina (Çevik et al., 2007; Malik et al., 2018).

O cálcio é um elemento essencial, que se apresenta em grandes concentrações no PS e atua como regulador da fisiologia espermática. Este cátion está envolvido na estimulação da esteroidogênese nas células de Leydig dos testículos, na maturação espermática, na motilidade espermática e nos processos de capacitação e reação do acrossoma, ao atuar como ativador das vias de sinalização celular (Olivera et al., 2006; Banjoko e Adeseolu, 2013).

O magnésio é um importante cátion observado na maioria dos sistemas enzimáticos, causa modificações em substratos específicos e desempenha papel fundamental como cofator de muitas reações enzimáticas envolvendo o metabolismo energético e a síntese de ácidos

nucleicos. Além disso, atua como antagonista do cálcio intracelular e desempenha papel na motilidade dos espermatozoides e na espermatogênese (Bezerra, 2015; Dobrakowski et al., 2018). Adicionalmente, o magnésio, o sódio e potássio estimulam a ATPase. Esta enzima com função hidrolítica ajuda na transformação de energia para os espermatozoides (Zhou et al., 2015).

O ferro é o segundo oligoelemento mais importante em muitas enzimas e compostos de metaloproteínas. Este metal participa nos processos de oxigenação e redução, e os íons ferros são vitais para o crescimento e desenvolvimento normal das células, na síntese de DNA e na transferência de elétrons. O ferro pode induzir a peroxidação lipídica no sêmen, o que resulta na inibição da motilidade dos espermatozoides (Kasperczyk et al., 2015a)

A composição de açúcares do PS está relacionado com a fertilidade devido a sua importância na produção de energia nos espermatozoides, que utilizam adenosina trifosfato (ATP) para manter o meio intracelular e processos celulares como a motilidade espermática, capacitação, hiperativação e a reação acrossômica nos espermatozoides. O ATP é formado por meio da glicólise e a fosforilação oxidativa, dependendo da região anatômica do espermatozoide envolvido (Plessis et al., 2015).

Na motilidade espermática, o metabolismo energético a partir da glicose é requerido para a ativação do axômena e incluem a produção e regeneração de ATP e de intermediários como o NADPH, necessários para as vias de sinalização interna, que conduzem a fosforilação das proteínas flagelares ao movimento. O ingresso da glicose ao citosol ocorre através de transportadores como GLUT3 na peça intermediária ou o GLUT8 na região acrossomal. A glicose é transformada em glicose-6-fosfato pela enzima hexoquinase para gerar ATP ou NADPH, por uma das vias metabólicas dependendo do domínio do flagelo (Olivera et al., 2006).

O fósforo é importante no metabolismo celular, em especial pela sua participação direta nos mecanismos bioquímicos ligados ao metabolismo energético. Além disso, o fósforo está ligado à ativação e inativação de enzimas via quinases e fosfatases, importante na sinalização celular.

Uma característica fundamental na função dos espermatozoides é a composição lipídica da membrana plasmática e do PS. Os perfis lipídicos consistem em colesterol, fosfolipídios, triglicerídeos e ésteres de cera. A possível fonte de lipídios em PS pode ser os epidídimos, assim como os próprios espermatozoides. Os lipídios seminais, especificamente os fosfolipídios e o colesterol, tem especial relevância na estrutura e função da membrana plasmática dos

espermatozoides e podem desempenhar papéis significativos na estrutura espermática, metabolismo, capacitação e fertilização dos ovócitos. Existem diferentes tipos de fosfolipídios presentes no PS dentre os quais os plasmalogênios de colina são os principais fosfolipídios do PS dos ruminantes (Juyena e Stelletta, 2012; Kasperczyk et al., 2015b).

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. Aspectos Éticos

Todos os animais utilizados neste estudo foram conduzidos em estrita conformidade com as normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão preconizados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa - UFV (protocolo N° 28/2017).

4.2. Local do Experimento e Animais

O estudo foi conduzido na fazenda São Francisco, pertencente à Agro - Pecuária CFM Ltda, situada no município de Magda, nordeste do estado de São Paulo (20° 38' 34" LS; 50° 13' 32" LO). Foram selecionados 20 touros da raça Nelore com idades compreendidas entre os 19,8 e 22,7 meses, os quais foram distribuídos em dois grupos de acordo com suas características reprodutivas em touros aptos e inaptos para à reprodução de acordo com os critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

4.3. Avaliação andrológica

Todos os touros foram submetidos ao exame andrológico, que após a contenção individual em tronco apropriado, consistiu no exame dos órgãos reprodutivos internos por meio de palpação transretal das ampolas dos ductos deferentes, das glândulas vesiculares e próstata, e inspeção e palpação do prepúcio, pênis, testículos e epidídimos, observando-se forma, tamanho, posição, simetria e consistência de cada órgão. Posteriormente foi obtido o perímetro escrotal com auxílio de uma fita métrica na região mais larga do escroto, e realizada a coleta de sêmen pelo método de eletroejaculação avaliando-se os aspectos físicos do sêmen e a morfologia espermática (Vasconcelos, 2003; Siqueira, 2012).

Após a coleta foi realizada a avaliação das características físicas do sêmen, avaliando-se o turbilhonamento (movimento em massa dos espermatozoides) em uma gota de 10 µL sobre uma lâmina pré-aquecida, numa escala de 0 a 5, em microscopia óptica convencional em

aumento de 100 x. Para análise da motilidade espermática progressiva retilínea e do vigor espermático, uma alíquota de sêmen (10 µL) foi colocada entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas em mesa térmica a 37 °C) e analisada em microscopia óptica convencional com aumento de 100x, sendo observados mínimos de quatro campos microscópicos. A motilidade espermática foi avaliada de 0-100 % e o vigor espermático em escala de 0 a 5.

Para a análise morfológica dos espermatozoides, uma alíquota de sêmen foi diluída em 1 mL de solução formol salina tamponada (Hancoch, 1957). As patologias foram avaliadas em preparação úmida, entre lâmina e lamínula em aumento de 1000x sob imersão e avaliada por microscopia de contraste de fase. Em cada preparação foram contabilizadas 200 células, e se determinou a percentagem de espermatozoides com defeitos de acróssoma, cabeça, peça intermediária e cauda. Posteriormente, as patologias foram classificadas em defeitos maiores, menores e totais de acordo com Blom (1973), tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

4.4. Preparação do plasma seminal

O ejaculado de cada touro foi centrifugado a 700 x g por 10 minutos para separar os espermatozoides do PS. As amostras do PS foram armazenadas em palhetas de 0,5 mL e estocadas em nitrogênio líquido a -196 °C até o dia das análises. Posteriormente, 3 mL de PS de cada touro foram descongelados e filtrados através de uma membrana com malha de 0,22 µm (Magalhães et al., 2016).

4.5. Determinação dos componentes bioquímicos do plasma seminal

Após filtração foram retirados 1 mL de PS para determinar a concentração de Glicose (GPO-PAP), Proteínas totais (biureto, colorimétrico), Albumina (verde bromocresol, colorimétrico), Ureia (enzimático-colorimétrico), Colesterol (enzimático-colorimétrico com LCF), HDL (enzimático-colorimétrico), LDL (Enzimático colorimétrico), Triglicerídeos (enzimático-colorimétrico), Cálcio (o-cresolftaleína-complexona), Magnésio (azul xilidila), Fósforo (fosfomolibdato UV), Cloreto (colorimétrico), Ferro (goodwin modificado), Sódio e Potássio (fotometria de chama). As determinações foram realizadas por meio do analisador automático bioquímico HumanStar 300 (Diamond Diagnostics, USA) e o fotômetro de chama B462 (Micronal S.A, Brasil), de acordo com os protocolos preconizados pelos fabricantes.

4.6. Extração e quantificação de proteínas solúveis

A extração das proteínas solúveis foi realizada a partir de 100 µL de PS filtrado, os quais foram precipitados usados em 600 µL de solução de acetona gelada (50 %, v/v), éter (50 % v/v), ácido tricloroacético (5 %, p/v) e 1 mM de ditioneitol (DTT) e ressuspensos em 250 µL de solução de solubilização (7 M Ureia, 2 M Tiourea, 4 % CHAPS (3-(3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propanesulfonate), 40 mM de DTT). Em seguida, foi determinada uma curva analítica de calibração obtida a partir de soluções padrões com concentrações de albumina sérica bovina (BSA). Quantidades conhecidas de BSA foram homogeneizadas em 150 µL do reagente Bradford 1 X, adicionando-se posteriormente água milli-Q até completar um volume final de 200 µL.

A solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e foram realizadas as leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda de absorbância de 595 nm. Além das concentrações de proteínas previamente conhecidas, uma triplicata foi realizada utilizando-se apenas água destilada (branco). Do resultado obtido, foram calculadas as médias da absorbância das leituras e subtraído a média da leitura do branco e da placa vazia, obtendo-se uma equação linear ajustada em função da concentração. Para quantificar as proteínas do plasma seminal, o procedimento foi igual ao da obtenção da curva de calibração, sendo o resultado baseado em equação (Bradford, 1976).

4.7. Processamento das proteínas do plasma seminal

As proteínas do plasma seminal foram processadas por meio de três abordagens eletroforéticas de separação:

4.7.1. Eletroforese Monodimensional (SDS-PAGE)

O SDS-Glicina-PAGE foi realizado correndo o gel em dois estágios (separação: 14 % T, 3,0 % C; empilhamento: 5,1 % T, 2,6 % C) a 80 volts por 15 minutos e 60 volts por 4 horas, utilizado o equipamento mini-gel (Mini-PROTEAN Tetra Cell; Bio-Rad). Foram utilizados 25 µg de proteína solúveis por amostra e foi usado um marcador de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad) para comparação entre as amostras. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) por duas horas e descorados por 10 horas (Laemmli, 1970).

4.7.2. Short-Run

Após a análise do perfil das proteínas separadas por SDS-PAGE, 60 µg de proteína de cada amostra foram adicionados num tubo novo para formação dos pools por cada grupo de animais segundo suas características reprodutivas (aptos e inaptos a reprodução). Posteriormente, cinco réplicas de cada pool contendo 50 µg de proteínas de cada uma foram submetidas à migração por aproximadamente um centímetro de resolução em gel SDS-Glicina-PAGE 14 %. Depois da corrida, os géis foram cortados em duas partes, as quais foram colocadas em solução fixadora (metanol 40 %, ácido acético 5 %) por duas horas. Em seguida, uma das partes foi submetida à revelação das proteínas em solução de coloração de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) por 15 horas, aproximadamente, enquanto a outra parte foi armazenada em solução de ácido acético 5 %. Os géis foram digitalizados usando o programa ImageScanner III (GE Healthcare, EUA) e salvos em formato .TIF (Resjo et al., 2017).

4.7.3. Eletroforese bidimensional (SDS-PAGE 2-DE)

As amostras de plasma seminal foram submetidas a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida para separação das proteínas com base em seu ponto isoelétrico e massa molecular (Moura et al., 2006; Novak et al., 2010). Alíquotas de plasma seminal contendo 80 µg proteína total de cada pool foram ressuspensas em solução Destreak (GE Healthcare, EUA) e DTT 1 M, aplicadas na bandeja de hidratação e incubadas em Drystrip de 7 cm com gradiente pH entre 4 a 7 por 22 horas a temperatura ambiente.

A focalização foi feita com auxílio do equipamento ETTAN™ IPGphor 3™ (GE, Lifesciences, EUA) de acordo a seguinte programação: 300 volts por 12 h, seguido de 500 volts por 4 h. Posteriormente, foi aplicada uma corrente gradativa de 300 v/h até completar 1000 volts. Depois, 2000 volts por 4 h, 5000 volts por 6 horas, 8000 volts por 6 horas, e finalmente, 200 volts por 7 h. Após a focalização, as Drystrip foram incubadas por 30 minutos em tampão de redução (6 M ureia, 30 % de glicerol, 2 % SDS, 2 % de DTT, 75 mM. L-1 de Tris; HCL, pH 8,8) e reequilibradas por 30 minutos adicionais em tampão de alquilação (similar ao tampão de redução, contendo 5 % de iodoacetamida, ao invés de DTT). Em seguida, foram dispostas sobre géis de poliacrilamida (14 %) e seladas com solução agarose (0,5 % agarose, 0,002 % azul de bromofenol).

Em cada gel, foi colocado 7 µL de marcador de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad). As fitas com as proteínas separadas por seu ponto isoelétrico foram submetidas ao sistema para separação das proteínas pelo peso molecular a 70 volts por aproximadamente 180 minutos.

Após a separação com base na massa molecular, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad).

Os géis bidimensionais foram digitalizados (300 dpi) e salvos em formato MEL usando o programa ImageScanner III (GE Healthcare, EUA). As imagens dos géis SDS PAGE 2-DE, foram analisadas no aplicativo ImageMaster 2D Platinum, versão 7.5 (GE Healthcare, EUA), no qual, os spots correspondentes às proteínas foram detectados automaticamente, conferidos e editados manualmente quando necessário. A análise permitiu estimar a abundância das proteínas, por meio da aferência do volume de cada spot, baseado em parâmetros de densidade ótica e área dos referidos spots. A análise também nos forneceu a estimativa do ponto isoeletrico, baseado no tamanho e na faixa de pH da fita, e das massas moleculares, baseado na referência dos marcadores de massa molecular utilizados (Magalhães et al., 2016).

4.7.4. Digestão de proteínas em gel

As proteínas do plasma seminal separadas por eletroforese bidimensional e short-run foram descoradas e submetidas à digestão com tripsina no gel. Todos spots e as banda foram excisados individualmente das replicas (técnica de triplicata para a eletroforese bidimensional e quintuplicata para short-run), reunidos, cortados em pedaços menores e transferidos a micro tubos limpos. O corante foi removido dos spots depois de três lavagens em 200 µL de 50 % (v/v) acetonitrila (ACN) e 25 mM bicarbonato de amônio (pH 8.0).

Os pedaços de gel foram desidratados depois de duas incubações com 200 µL de ACN 100 % por 5 minutos e secos usando o sistema de concentração de vácuo (AG22331, Eppendorf, Alemanha). As proteínas presentes nos fragmentos dos géis foram reduzidas em 100 uL de DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, a 56 °C por 30 minutos. Em seguida, as proteínas foram alquiladas com 100 µL de iodoacetamida 200 mM e bicarbonato de amônio 100 mM a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Posteriormente, os fragmentos dos géis foram lavados, hidratados e desidratados com bicarbonato de amônio e ACN por duas vezes, respectivamente. Finalmente, eles foram secos no sistema de concentração de vácuo.

As amostras de gel seco foram reidratadas em banho-de-gelo com solução de tripsina de pâncreas suíno, na concentração final de 25 ng/µL em solução de ativação (bicarbonato de amônio 40 mM, e ACN 10%). Após 45 min em gelo, foram adicionados 50 e 100 µL da solução de ativação aos tubos contendo os fragmentos dos géis provenientes da eletroforese bidimensional e short-run, respectivamente.

As amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C por 22 h. Após a digestão enzimática, as amostras foram sonicadas por 10 minutos, agitadas em vórtex por 20 segundos e as soluções foram removidas para microtubos limpos. Na sequência, foram adicionados 100 e 200 µL da solução contendo ácido fórmico 5 % (v/v) em ACN 50 % (v/v) aos géis restantes de eletroforese bidimensional e short-run, respectivamente. Cada microtubo foi submetido à agitação em vórtex por 20 segundos, mantido em temperatura ambiente por 15 min e sonificado por 2 minutos. A solução foi removida e adicionada à solução anteriormente reservada no tubo limpo. Este passo foi repetido mais duas vezes, a solução foi transferida para o microtubo limpo. As amostras contendo os peptídeos foram concentradas em sistema de centrifugação a vácuo (Shevchenko et al., 2006).

Após a secagem a vácuo, foram adicionados 10 µL de solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % (v/v) em água ultrapura a cada microtubo. Em seguida, os peptídeos tripticos foram dessalinizados utilizando-se micro colunas de fase reversa C18 (ZTC18S096, Millipore, EUA) e eluídos em solução de ACN 50 %, acidificada com TFA 0,1 %.

4.8. Espectrometria de massa

4.8.1. LC-MS/MS

Os peptídeos constituintes das réplicas oriundas do short-run foram solubilizados em 20 µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % (grau de pureza LCMS) e acondicionados em tubos apropriados para a aplicação no sistema nano LC-MS/MS. Após o preparo da amostra, 1 µL da solução foi analisado por nano LC-MS, utilizando o sistema UPLC nanoAcquity (Waters, EUA), contendo uma coluna trap modelo nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap 5 µm Symmetry® C18 180 µm x 20 mm, em uma taxa de fluxo de 7 µL/min., durante 3 minutos. A separação dos peptídeos ocorreu por uma coluna nanoAcquity UPLC® 1.7 µm BEH130 100 µm x 100 mm, operando com taxa de fluxo de 0,3 µL/min. A fase móvel do processo cromatográfico teve como solventes a água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (solvente A) e a ACN acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (solvente B). A separação cromatográfica ocorreu conforme a seguinte programação: 2 % de B por 1 minuto; gradiente de 2 a 30 % de B por 299 minutos; gradiente de 30 a 85 % de B por 5 minutos; manutenção em 85 % de B por 5 minutos; gradiente de 85 a 2 % de B por 5 minutos; e, manutenção em 2 % de B por 5 minutos, totalizando 320 minutos de análise cromatográfica.

Os peptídeos eluídos foram automaticamente injetados em espectrômetro de massas modelo MAXIS 3G (Bruker Daltonics, Alemanha), atuando no modo online, com uma fonte de ionização CaptiveSpray. A análise dos peptídeos foi realizada por meio de método apropriado para os mesmos (IE_GCF_01-02-2017), com o fluxo de gás de secagem de 3 L/min, temperatura da fonte de ionização de 150 °C e voltagem de transmissão de 2 kV. Os dados brutos foram convertidos em uma lista de massas na extensão .mgf (Mascot Generic Format), a qual foi submetida ao Mascot Daemom para o confronto contra o banco de dados.

4.8.2. Maldi TOF/TOF

Os peptídeos trípticos provenientes dos spots da estratégia de SDS-PAGE 2DE foram ressuspendidos em 5 µL de solução de ACN 50 %, acidificada com TFA 0,1 %. A matriz utilizada foi constituída por ácido α ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), a qual também foi solubilizada em ACN 50 %, acidificada com TFA 0,1 %, na concentração final de 10 mg/mL. Para a calibração do método de análise MS1 foram utilizados peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics, Alemanha). A seguir, 1 µL da amostra de peptídeos trípticos e 1 µL da matriz foram aplicados e homogeneizados em cada spot da placa de aço polida apropriada para análise de MALDI, os quais foram secos à temperatura ambiente.

Os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha). Para obtenção dos dados de MS1 utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da. Para a realização de MS2, foi utilizado o método LIFT no modo positivo, sendo selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z).

Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo software FlexControl, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do aplicativo FlexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato .mgf pelo aplicativo BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

4.8.3. Identificação das proteínas

Em ambas as estratégias, as listas de massas geradas foram confrontadas contra o banco de dados de proteínas da família Bovidae (download em 22/03/2018, com 91.453 entradas) depositado no Uniprot Consortium.

As listas de massas com extensão .mgf foram confrontadas contra o banco de dados de proteínas por meio do aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Para os dados adquiridos no LC-MS/MS foram permitidas tolerâncias de erro para o íon parental de 30 ppm e 0,6 Da para os fragmentos, com a carga dos íons variando entre +2 e +4. Para os dados adquiridos pelo MALDI TOF/TOF, as tolerâncias de erro foram 0,2 Da para o íon parental e 0,5 Da para os fragmentos, na análise de peptídeos monocarregados (+1).

As proteínas identificadas pelo MASCOT como “Uncharacterized” foram analisadas usando o software BLAST, versão 2.4.0 (Altschul et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados protein non-redundant (nr) do NCBI que apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”.

Os resultados obtidos pelo MASCOT foram validados estatisticamente pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INC., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo Peptide Prophet (Keller et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo Protein Prophet (Nesvizhskii et al., 2003), como critério de aceitação dos resultados adquiridos pelo MALDI TOF/TOF foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90 % de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada. Nos resultados adquiridos pelo LC-MS/MS foram aceitos com a probabilidade mínima de 95 % para ambos e, pelo menos, dois peptídeos presentes em cada proteína identificada. A proteína foi considerada identificada se foi encontrada em pelo menos duas réplicas com os mesmos peptídeos encontrados.

4.8.4. Classificação funcional das proteínas

Os termos de ontologia gênica das proteínas identificadas foram obtidos do banco de dados UniprotKB usando a taxonomia mamíferos para os processos biológicos e classes de proteínas. As figuras para os termos foram geradas online do PANTHER, versão 10 (Mi et al., 2016).

4.8.5. Análise quantitativa das proteínas identificadas

Das proteínas identificadas foram escolhidas aquelas que estavam presentes em pelo menos três réplicas técnicas de cada tratamento (touro apto e inapto à reprodução). A

abundância das proteínas selecionadas foi estimada pelo método emPAI, usando o software SCAFFOLD Q+, versão 4.0 (Proteome Software, USA) (Pini et al., 2018). Para as proteínas em que a quantificação não apresentou estimativa para alguma das réplicas estudadas, foi considerado o menor valor observado dentre as réplicas de um mesmo tratamento (Lazar et al., 2016). Os dados foram normalizados pelo teste de Shapiro (Lopes et al., 2013; Nascimento et al., 2015) e homogeneidade foi verificada pelo teste de Bartlett (Correa et al., 2006). Após a verificação da normalidade e sua homogeneidade dos dados, foram submetidos ao teste T-Student, com erro menor que 5 % ($p < 0,05$) (Nowicka-Bauer et al., 2018). Além dos parâmetros acima descritos, apenas as proteínas que apresentaram um fold change acima de 1,5 vezes foram consideradas diferencialmente abundantes (Saraswat et al., 2017).

4.8.6. Análise das redes de interação das proteínas

As proteínas que foram expressas diferencialmente entre os grupos foram analisadas a partir de base de dados STRING 10.5 (<http://www.string-db.org>), a partir de predições coletadas baseando-se em associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais), integrando evidências de várias fontes, bem como contexto genômico, experimentos em larga escala, co-expressão e dados obtidos a partir de publicações de pesquisa (Szklarczyk et al., 2011).). A análise foi realizada pela relação de evidência entre os pontos de interação apresentados na rede e a base de dados pesquisada, com pontuação de confiabilidade maior que 0,9 (Viana et al., 2018).

4.8.7. Análise estatístico

Para a análise dos dados foram utilizados o programa estatístico SAEG versão 9.1. (SAEG – UFV, 2007) e o pacote R. As variáveis foram submetidas a análise de variância. Foram usados coeficientes de correlação de Pearson para determinar a relação entre as características estudadas. O nível de significância adotada foi de 5 %.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fertilidade do touro é uma das características mais importantes do rebanho de corte e é definida como a capacidade dos espermatozoides para fertilizar o ovócito e manter o desenvolvimento embrionário (Parisi et al., 2014). Vários fatores determinam a capacidade de fertilização dos espermatozoides dos mamíferos, incluindo os intrínsecos à célula e os componentes do plasma seminal (Viana et al., 2018). Para predizer a capacidade reprodutiva dos touros, vários parâmetros envolvendo as medidas testiculares e a qualidade do sêmen são avaliados por meio do exame andrológico (Oliveira et al., 2011).

Assim, no presente estudo foram avaliadas as características andrológicas de touros jovens da raça Nelore, classificados com aptos e inaptos à reprodução. Não foram observadas diferença ($p>0,05$) nas médias das características físicas dos ejaculados entre os grupos de animais estudados, porém, houve diferença ($p<0,001$) na porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos, sendo maior no grupo de touros classificados como inaptos à reprodução (Tabela 1).

TABELA 1: Valores médios, máximos e mínimos do perímetro escrotal e características físicas e morfológicas dos espermatozoides de touros da raça Nelore, entre 19,8 a 22,7 meses de idade classificados como aptos e inaptos à reprodução

Variável	Touros Aptos (n=10)	Touros Inaptos (n=10)	Media	CV	V. Min	V. Max
PE	34,91 ± 1,22	34,51 ± 1,52	34,61 ± 1,39	3,99	31,00	36,60
Vol	3,40 ± 0,69	4,70 ± 1,33	4,05 ± 1,23	26,35	2,00	6,00
Asp	2,70 ± 0,67	2,60 ± 0,51	2,65 ± 0,58	22,68	2,00	4,00
Turb	1,65 ± 1,49	0,70 ± 0,82	1,17 ± 1,27	102,53	0,00	4,00
Mot	70,00 ± 11,05	61,00 ± 23,66	65,00 ± 18,56	28,20	0,00	90,00
Vig	3,15 ± 0,34	2,80 ± 1,01	2,97 ± 0,75	-	0,00	4,00
Morf	12,30 ± 3,27 ^b	32,90 ± 9,48 ^a	22,60 ± 12,62	31,37	9,00	50,00

CV: Coeficiente de Variação; PE: Perímetro escrotal (cm); Vol: Volume do ejaculado (mL); Asp: Aspecto; Turb: Turbilhonamento (0-5); Mot: Motilidade (%); Vig: Vigor (0-5); Morf: Morfologia (%). $P<0,05$.

O perímetro escrotal (PE) é uma característica usada frequentemente nos programas de Melhoramento Genético Animal por ser um parâmetro de fácil mensuração e apresentar moderada herdabilidade e alta repetibilidade (Penitente-Filho et al., 2018). Além de se correlacionar positivamente com o ganho de peso ao nascimento, ao desmame e ao sobreano, e com as características reprodutivas das fêmeas (idade ao primeiro parto, probabilidade de prenhez, intervalo entre partos) e as características reprodutivas dos machos como o volume testicular, produção diária de espermatozoides e os defeitos espermáticos (Siqueira et al., 2013).

Os touros avaliados no presente estudo pertencem a um rebanho submetido a um programa de Melhoramento Genético desde 1983, com foco na seleção do ganho de peso a pasto, precocidade sexual e qualidade da carcaça, incluindo o PE como uma das características avaliadas, o que pode explicar porque não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nas médias do PE nos animais do presente estudo. Ressalta-se ainda que as médias observadas neste estudo para o PE foram superiores à reportadas por outros autores em touros jovens *Bos taurus indicus* criados extensivamente (Lima et al., 2013; Maciel et al., 2015; Crisóstomo et al., 2016), demonstrando assim a importância da implementação dos programas de Melhoramento Genético Animal.

Observou-se neste estudo que as médias dos parâmetros volume do ejaculado, motilidade espermática e vigor espermático se apresentaram dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (2013) para o sêmen bovino.

A motilidade espermática é uma característica usualmente avaliada na determinação da funcionalidade dos espermatozoides por estar correlacionada com a capacidade da célula de se locomover até o sítio de fertilização e atingir o ovócito no momento da fecundação (Khatun et al., 2018). Porém, tem sido observada baixa correlação entre a motilidade espermática e a capacidade fertilizante dos espermatozoides, uma vez que, muitas células espermáticas podem apresentar motilidade mas estar danificadas de tal maneira que a penetração e a fertilização do ovócito sejam improváveis (Oliveira et al., 2011). Esta observação pode explicar o porquê não foram verificadas diferenças ($p>0,05$) da variável motilidade espermática entre os grupos de animais estudados, e a diferença ($p<0,001$) na porcentagem de espermatozoides defeituosos nos grupos de touros aptos e inaptos à reprodução.

Contrário ao observado com a motilidade espermática, a morfologia dos espermatozoides apresenta uma correlação direta com sua capacidade fertilizante (Freneau, 2011). Dependendo do tipo de patologia, quanto o maior número de espermatozoides com defeitos, menor é sua capacidade de penetração e desenvolvimento embrionário inicial (Arruda et al., 2015). Fatores genéticos, ambientais, deficiências nutricionais, idade e alterações anatômicas ou fisiológicas nos órgãos genitais masculinos apresentam relação com a incidência de defeitos espermáticos nos touros (García-Vázquez et al., 2016).

Por outro lado, os valores das variáveis do perfil bioquímico do plasma seminal de touros da raça Nelore no presente estudo apresentaram diferenças ($p<0,05$) entre as concentrações de triglicerídeos, colesterol e ferro (Tabelas 2 e 3). O grupo de touros classificados como aptos à reprodução mostrou maior concentração de triglicerídeos e ferro e

menor concentração de colesterol com relação ao grupo de reprodutores classificados como inaptos à reprodução.

A concentração média de colesterol no grupo de touros classificados como inaptos (34,1 mg/dL) foi inferior à reportada por Beer-Ljubic et al. (2009) em touros da raça Simental (178,9 mg/dL) com dois a quatro anos de idade, durante as quatro estações do ano na Croácia, e maiores do que as observadas por Çevik et al. (2007) em touros adultos *Bos taurus taurus* (24,7 mg/dL).

Sabe-se que a membrana das células espermáticas apresenta propriedades únicas como alta capacidade de motilidade e de fusão, as quais dependem em grande parte, de seu conteúdo lipídico. Os lipídios da membrana dos espermatozoides estão associados positivamente com a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides (Kasperczyk et al., 2015b). Os esteróis desempenham o papel mais importante na modificação das características da membrana das células espermáticas, sendo o colesterol o mais efetivo para modular as propriedades da membrana (Rozman e Horvat, 2013).

O processo de maturação dos espermatozoides está associado com diminuição na proporção de colesterol em relação a outros esteróis como o desmosterol. Consistentemente, a maior concentração de colesterol está presente em espermatozoides imaturos, imóveis e inférteis (Liu et al., 2015). Alguns estudos em homens têm evidenciado uma relação entre altas concentração de colesterol e um reduzido número de espermátides, um diâmetro menor dos túbulos seminíferos e maior número de espermatozoides com defeitos de acrossoma (Attarman et al., 2012; Hagiuda et al., 2014; Withfield et al., 2015).

São várias as atribuições em relação ao papel do colesterol nos espermatozoides (Schisterman et al., 2014; Lui et al., 2017), sendo corroboradas pelo presente estudo, porém são discrepantes em relação às concentrações reportadas por Çevik et al. (2007) em sêmen de touros da raça Holandês com baixa motilidade espermática. Essas discordâncias podem ser resultado das diferenças nos métodos de coletas, o preparo e análises das amostras de sêmen, como também às variações genéticas e ambientais dos grupos de animais e aos lugares onde foram desenvolvidos os experimentos.

As concentrações de albumina no presente trabalho foram similares às obtidas por Trvdá et al. (2013) em touros da raça Simental, entretanto, o grupo de touros classificados como aptos à reprodução mostraram maior concentração em relação ao grupo de reprodutores inaptos à reprodução, o que pode ser benéfico para os espermatozoides do primeiro grupo (aptos à reprodução), pelo fato da albumina apresentar propriedades antioxidantes, devido aos grupos

tiol da cisteína. Esses grupos estão envolvidos nas reações de troca de tiol e atuam na eliminação de ROS. Além disso, a albumina sequestra moléculas pro-oxidantes e metais redox ativos (Dobrakowski et al., 2014).

TABELA 2: Perfil proteico-energético do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução

Variável	Touros Aptos (n=10)	Touros Inaptos (n=10)	Média	CV	V. Min	V. Max
PT	4,03 ± 1,98	3,77 ± 2,49	3,90 ± 2,19	57,61	0,90	7,74
Alb	1,14 ± 0,077	0,80 ± 0,65	0,97 ± 0,72	74,02	0,17	2,52
Ure	65,92 ± 14,69	62,30 ± 23,40	64,11 ± 19,10	30,48	26,80	95,90
Gli	2,00 ± 1,56	1,60 ± 1,71	1,80 ± 1,60	91,1	0,00	6,00
Tri	4,90 ± 1,91 ^a	2,20 ± 0,92 ^b	3,55 ± 2,01	42,25	1,00	7,00
Col	4,84 ± 1,78 ^b	34,10 ± 30,64 ^a	19,47 ± 25,91	-	2,00	83,00
HDL	7,30 ± 1,57	5,94 ± 2,75	6,62 ± 2,29	33,86	1,00	11,00
LDL	5,49 ± 1,66	5,54 ± 3,61	5,54 ± 2,74	50,76	0,30	11,03

BP: Baixa Patologia; AP: Alta Patologia; CV: Coeficiente de Variação; PT: proteínas totais (g/dL); Alb: Albumina (mg/dL); Ure: Ureia (mg/dL); Gli: Glicose (mg/dL); Tri: Triglicerídeos (mg/dL); Col: Colesterol (mg/dL); HDL: High Dense Lipoprotein (mg/dL); LDL: Light Dense lipoprotein (mg/dL). P<0,05.

Os triglicerídeos são fonte de energia metabólica para os espermatozoides e atuam como substrato para a produção de glicerol em espermatozoides maduros de mamíferos (Khalili et al., 2009). O glicerol é um metabolito importante no organismo animal, que conecta as vias metabólicas dos carboidratos e os lipídios (Crisóstomo et al., 2017). Este metabolito é convertido pela glicerolquinase em glicerol-3-fostato, o qual pode ser usado como base na gliconeogênese, glicólise, lipogênese e gliceroneogênese, além de influir indiretamente em outras vias metabólicas como a lipólise, a via das pentoses-fosfato, o ciclo do Krebs e na fosforilação oxidativa (Mohammad et al., 2015; Wu et al., 2015). Dependendo do local anatômico, os espermatozoides podem utilizar algumas destas vias para a geração de energia, chave em processos como a capacitação espermática e a hiperativação (Flores e Vilanova, 2015).

O glicerol entra na célula espermática por meio das aquagliceroporinas que regulam a disponibilidade do substrato para o metabolismo do glicerol no interior da célula (Bernardino et al., 2016). As aquagliceroporinas são proteínas transmembrana que pertencem a família das aquaporinas, no qual regulam o balanço hidro e osmótico dos espermatozoides, importante para uma adequada motilidade (Chen et al., 2011; Bernardino et al., 2013).

Hagiuda et al. (2014) observaram associações positivas entre as concentrações de triglicerídeos e a motilidade espermática e morfologia dos espermatozoides humanos, porém,

alguns autores (Ergün et al., 2007) reportaram correlações entre as altas concentrações de triglicerídeos e espermatozoides com baixa motilidade.

As concentrações do componente mineral são apresentadas na Tabela 3. Os valores médios do cálcio, fosforo e ferro foram menores aos observados por Machal et al. (2002), e Tvrdá et al. (2013). Por sua parte, as concentrações de sódio, potássio e magnésio foram maiores às reportadas por Asadpour (2012) e Çekiv et al. (2007). Todas as concentrações do perfil mineral foram menores às reportadas por Abdel-Rahman et al. (2000) e Valsa et al. (2013) em ovinos e homens, respectivamente. São várias as causas (espécie animal, técnica de análises, nutrição, entre outras) das diferenças entre as determinações das concentrações dos elementos minerais no plasma seminal, porém a falta de valores de referência para a espécie bovina dificulta a interpretação dos resultados e sua importância fisiológica no presente estudo.

Os macros e microminerais são necessários para as atividades de muitas enzimas nas vias metabólicas e desempenham papel crucial na espermatogênese, motilidade espermática e na fertilização (Wong et al., 2001). As interações entre estes elementos no sêmen são complicadas e ainda pouco compreendidas. Alterações nas concentrações em qualquer intervalo fisiológico pode ter um efeito negativo na qualidade do sêmen (Kasperczyk et al., 2015a).

TABELA 3: Perfil mineral do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução

Variável	Touros Aptos (n=10)	Touros Inaptos (n=10)	Media	CV	V. Min	V. Max
Ca	10,79 ± 2,16	11,57 ± 2,20	11,18 ± 2,16	19,49	7,70	14,30
Cl	98,78 ± 27,91	84,87 ± 25,45	91,82 ± 26,96	29,09	52,60	139,90
Fe	789,24 ± 73,90 ^a	678,94 ± 119,25 ^b	734,09 ± 111,91	13,51	495,62	886,87
Mg	3,45 ± 0,79	3,37 ± 0,31	3,41 ± 0,24	7,14	2,60	3,70
P	3,82 ± 0,79	3,24 ± 1,43	3,53 ± 1,16	32,75	1,70	5,70
Na	130,20 ± 9,31	123,90 ± 10,17	127,05 ± 10,02	7,68	104,00	143,00
K	19,91 ± 7,26	24,45 ± 14,17	22,18 ± 11,20	50,78	12,10	62,20

CV: Coeficiente de Variação; Ca: Cálcio (mg/dL); Cl: Cloreto (mEq/L); Fe: Ferro (ug/dL); Mg: Magnésio (mg/dL); P: Fósforo (mg/dL); Na: Sódio (mmol/L); K: Potássio (mmol/L). P<0,05.

O ferro é um dos minerais mais abundantes no organismo e cumpre papel fundamental como componente ecofisiológico essencial das células e tecidos presentes nos órgãos genitais masculino (Tvrdá et al., 2015). Em quantidades relativamente pequenas, este microelemento atua como cofator de ampla variedade de moléculas bioativas, entretanto, sua acumulação em grandes quantidades pode gerar transtornos metabólicos que podem comprometer a fertilidade masculina (Wang e Pantopoulos, 2011)

O ferro está envolvido em uma grande variedade de reações redox como constituinte de enzimas antioxidante como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) que neutralizam ou eliminam o excesso de ROS, protegendo os espermatozoides dos danos oxidativos (Letelier et al., 2010). Kanwal et al. (2000) e Tvrdá et al. (2012) reportaram correlações positivas e significativas entre as concentrações de ferro e a motilidade espermática em búfalos e touros respectivamente.

Entretanto, Kasperczyk et al. (2016) não observaram efeito do ferro sobre a motilidade espermática, mas sugerem, que altas concentrações podem influenciar no tipo de motilidade exibida pelos espermatozoides ao diminuir a linearidade e velocidade dos movimentos das células espermáticas. Este fenômeno pode estar relacionado ao efeito tóxico do ferro acumulado, sendo o resultado da reação de Fenton e Haber-Weiss, no qual formam radicais livres que se ligam aos ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática dos espermatozoides ocasionando danos estruturais e funcionais (Kehrer, 2000; Aitken et al., 2016).

As concentrações de sódio foram maiores no grupo de touros classificados aptos à reprodução, embora apresentaram menor concentração de potássio. Este mesmo padrão foi observado por Tvrdá et al. (2013) onde o sódio apresentou correlação positiva com a motilidade de espermatozoides dos touros adultos da raça Simental, por participar do equilíbrio osmótico e o sistema antioxidante do plasma seminal.

O potássio é um inibidor metabólico natural no plasma seminal, e em altas concentrações diminui a motilidade espermática ao inibir a glicólise e a síntese de frutose. A frutose é o sacarídeo mais importante no PS dos ruminantes, a qual participa na formação de ATP que é essencial no metabolismo celular e motilidade espermática (Juyena e Spelletta, 2012). Estas observações poderiam explicar o porquê o grupo dos touros inaptos à reprodução apresentou, embora não significativa, menor porcentagem de espermatozoides móveis em comparação com o grupo de animais classificados como aptos (61,0 e 70,0 %, respectivamente), considerando que apresentaram menor concentração de glicose, menor concentração de sódio e maior concentração de potássio.

Os valores das correlações simples de Pearson do perfil bioquímico do plasma seminal estão sumarizados na Tabela 4. O colesterol apresentou correlações negativas com a concentrações de proteínas totais, magnésio, triglicerídeos, HDL e LDL. O HDL se correlacionou positivamente com as concentrações de magnésio e fosforo e negativamente com o cloreto e o sódio. A ureia não apresentou correlações com as outras variáveis, enquanto a glicose correlacionou com o cloreto.

TABELA 4: Correlações simples de Pearson das características bioquímicas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução.

	PT	Alb	Ure	Gli	Col	Tri	Ca	P	Mg	Fe	Cl	Na	K	HDL	LDL
PT	1														
Alb	0,53	1													
Ure	NS	NS	1												
Gli	NS	NS	NS	1											
Col	-0,48	NS	NS	NS	1										
Tri	NS	NS	NS	NS	-0,53	1									
Ca	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1								
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,43	1							
Mg	0,59	NS	NS	NS	-0,62	NN	NS	NS	1						
Fe	-0,48	NS	NS	NS	NS	0,45	NS	0,53	NS	1					
Cl	-0,47	NS	NS	0,47	NS	NS	NS	NS	-0,64	NS	1				
Na	NS	0,51	NS	NS	NS	NS	-0,48	-0,4	NS	NS	0,51	1			
K	NS	-0,5	NS	NS	NS	NS	0,44	NS	NS	-0,49	NS	-0,58	1		
HDL	0,46	NS	NS	NS	-0,44	0,42	0,53	0,71	0,71	0,43	-0,47	-0,57	NS	1	
LDL	0,7	NS	NS	NS	-0,41	NS	0,47	0,41	0,64	NS	-0,54	-0,49	NS	0,74	1

PT: proteínas totais; Alb: Albumina; Ure: Ureia; Gli: Glicose; Tri: Triglicerídeos; Col: Colesterol; Ca: Cálcio; Cl: Cloreto; Fe: Ferro; Mg: Magnésio; P: Fosforo; Na: Sódio; K: Potássio; NS: Não significativo.

O mapa das proteínas do plasma seminal de touros classificados como aptos e inaptos à reprodução, separadas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida estão sumarizadas na Figura 4. A análise do software Image Master III detectou em média 41 spots no conjunto de géis dos touros aptos (42 spots) e inaptos (40 spots) à reprodução. De acordo com as análises de densidade óptica do percentual de volume de cada spot detectado, não foram observadas diferenças de abundância entre os grupos de animais estudados ($p>0,05$).

Dos 42 spots detectados no grupo de touros aptos à reprodução, 31 spots foram identificados por espectrometria de massa utilizando o MALDI TOF/TOF, o que correspondeu a nove proteínas diferentes com peso molecular entre os 15,0 e 70,0 kDa, e ponto isoelétrico de 4 a 7 (Tabela 5). Duas proteínas da família Spermadhesin (Spermadhesin 1, Spermadhesin 2) e as três proteínas da família BPS (BSP PDC-109, BSP A3, BPS-30 kDa) foram identificadas. O número de spots detectados e o número de proteínas identificadas foram menores aos reportados por Assumpção et al. (2005) e Rêgo et al. (2016) para touros adultos das raças Nelore e Guzera, respectivamente.

Entretanto, não foi possível calcular o percentual de intensidade dos spots em relação às proteínas identificadas devido ao fato de que algumas proteínas de famílias diferentes apresentaram spots em comum, porém, considerando o número de spots identificados para cada

proteína, a Spermadhesin 1 (8/31 Spots) foi a proteína com maior quantidade relativa dentro do grupo de touros classificados como aptos à reprodução (Figura 5).

Algumas proteínas da família BSP apresentam o-glicosilação nos resíduos de treonina do segmento N-terminal, proporcionando a estas proteínas a propriedade de formar agregados entre elas e entre proteínas da família das Spermadhesin (Serrano et al., 2013; Joiset al., 2015; Plante et al., 2016). Essa particularidade somada as dificuldades que sobrepõe a glicosilação na migração e separação das proteínas em géis de poliacrilamida e à similaridade entre os pesos moleculares e os pontos isoelétricos entre a BSP PDC-109 e a Spermadhesin 1 poderiam explicar porque foram identificadas compartilhando alguns spots.

Outro aspecto a ser considerado é a baixa sensibilidade do MALDI TOF/TOF na análise de proteínas com as características mencionadas anteriormente, dificultando ainda mais a identificação das proteínas. Porém, há de se ressaltar a importância da utilização da eletroforese bidimensional no estudo das isoformas das proteínas e o baixo custo das análises por MALDI TOF/TOF em comparação com outras abordagens (Magalhães et al., 2016).

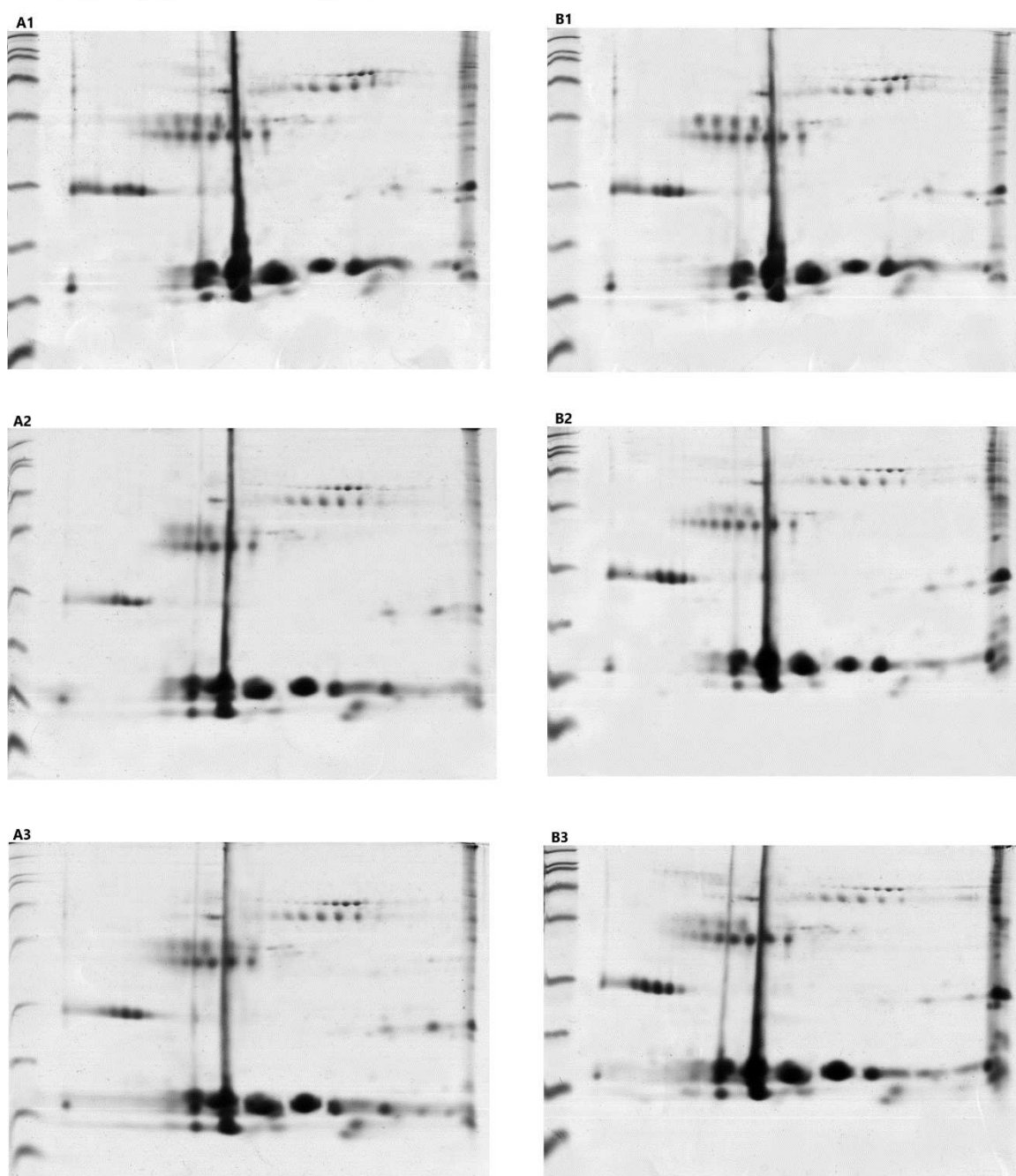


Figura 4. Perfil proteômico bidimensional do plasma seminal de touros da raça Nelore entre 19,8 a 22,7 meses de idade, classificados como aptos (A1-A3) e inaptos à reprodução (B1-B3).

TABELA 5: Proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 a 22,7 meses de idade, classificados como aptos à reprodução, separadas por eletroforese bidimensional e identificadas por MALDI TOF/TOF

Numero de acesso	Spot ID	Proteína	Escore de identificação	Prob. PT	Cobertura	Teórico		Experimental		Sequência dos peptídeos	Prob. PP
						PM	pI	PM	pI		
P29392	2	Spermadhesin-1	119	100%	19%	15,0 kDa	5,06	14,4 kDa	4,7		
	3		89	99%	12%						
	4		194	100%	28%					TNCVWTIQMPPEYHVR	98%
	5		154	100%	19%					ICEGSLMDYR	97%
	7		87	98%	12%					NTNCGGILKEESGVIATYYGPK	100%
	9		117	100%	28%					YIREPEHPASFYEVLYFQDPQA	99%
	11		383	100%	45%						
	17		65	95%	12%						
P17697	23	Clusterin	117	99%	4%	51,1 kDa	5,73	48,2 kDa	5,3	RPQDTQYYSPFSSFPR	100%
	44		186	100%	4%					ASSIMDELFQDR	95%
	45		215	100%	9%					TQIEQTNEER	92%
	46		207	100%	6%						
	58		112	100%	9%						
P02784	5	Seminal plasma protein PDC-109	269	100%	39%	15,5 kDa	4,91	14,6 kDa	4,4	HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR	100%
	7		63	97%	1%					IGSMWMSWCSLSPNYDKDR	100%
	11		237	99%	17%					CVFPFIYGGK	97%
	14		154	99%	17%						
	17		353	100%	32%						
P81019	19	Seminal plasma protein BSP-30 kDa	160	100%	10%	21,2 kDa	5,73	19,7 kDa	4,5	FCTERDEPECVFPFIYR	99%
	20		338	100%	20%					VHSFFWR	96%
	41		185	100%	13%					WCSLTSNYDRDK	99%

Continuação											
Q4R0H2	12	Spermadhesin 2	213	100%	22%	15,2 kDa	5,92	14,1 kDa	5,3	ESLEIIEGPPPESSNSR KPNHPAPDFFLIFR	100% 100%
	15		230	100%	22%						
	16		320	100%	22%						
	17		109	95%	10%						
	36		71	95%	10%						
Q28017	30 31	Platelet-activating factor acetylhydrolase	358 86	100% 99%	11% 3%	50,1 kDa	6,12	49,3 kDa	6,1	DGSASSTYYFK	95%
										IPQPLFFINER	100%
										FQYPSNIIR	92%
										GSVHQNFVDFTFATSK	100%
P02769	32	Serum albumin	145	100%	5%	69,3 kDa	5,82	67,7 kDa	5,2	RPCFSALTPDETYVPK KVPQVSTPTLVEVSR	97% 100%
	33		150	100%	5%						
	35		137	99%	3%						
P04557	0	Seminal plasma protein A3	96	100%	15%	16,1 kDa	4,90	15,8 kDa	4,6	CVFPFIYGNKK	99%
	1		110	100%	15%						
	8		137	100%	15%						
A0A0E3UT00	21	Tissue inhibitor of metalloproteinase-2	110	95%	8%	21,7 kDa	7,01	20,2 kDa	6,7	EVDSGNDIYGNPIKR	100%
	22		122	95%	8%						

Prob. PT: probabilidade de identificação de proteína; PM: peso molecular; pI: ponto isoeletrico; Prob. PP: probabilidade de identificação de peptí

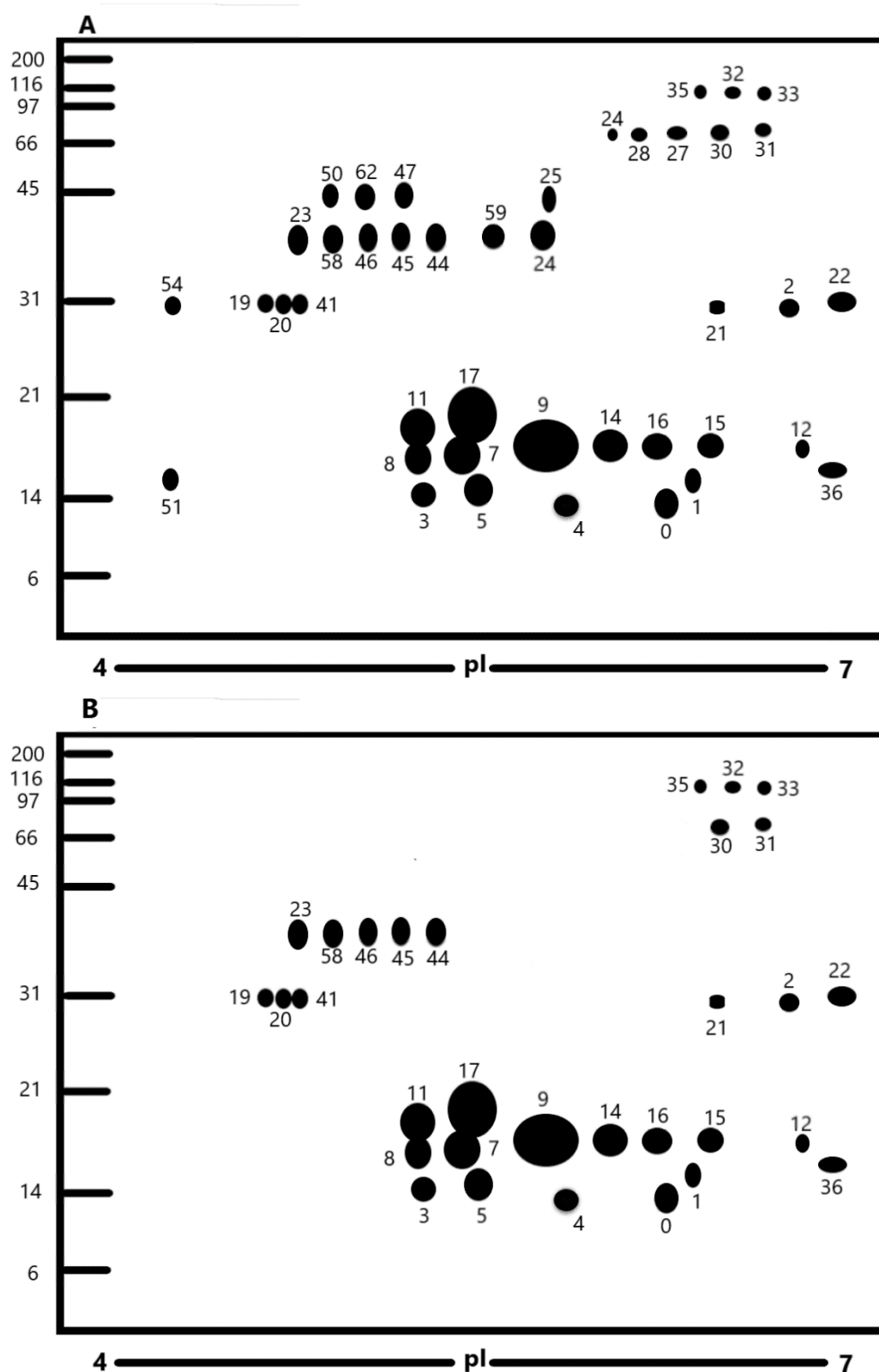


FIGURA 5: Mapa bidimensional dos spots do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 a 22,7 meses de idade. (A) representa o gel com os spots protéicos gerado pelas análises no Image Master III para o grupo de touros aptos à reprodução e (B) representa os spots identificados por MALDI TOF/TOF

Usando LC-MS/MS foram identificadas 298 proteínas no plasma seminal dos touros do presente estudo (Anexo 1). A Spermadhesin 1 representou 39,6 % do total das proteínas identificadas em ambos grupos, seguida da BSP PDC-109 (4,6 %) e Serine protease inhibitor clade E member 2 (4,0 %). A quantificação relativa das proteínas nos grupos de animais revelou maior abundância da Spermadhesin 1, no grupo de touros aptos à reprodução (48,6 %) em relação ao grupo de animais classificados como inaptos à reprodução (31,1%). Estes resultados são semelhantes aos reportados por Jobim et al. (2004), Roncoletta et al. (2006), e Codognoto et al. (2018), em plasma seminal de touros e búfalos. No entanto, diferem dos registrados por Rêgo et al. (2014) e Menezes et al. (2017), em que a BSP PDC-109 foi a proteína mais abundante do plasma seminal de touros identificadas por meio de diferentes metodologias.

A Spermadhesin 1 é uma proteína multifuncional que participa na união aos carboidratos e na interação entre os espermatozoides e o ovócito, além de inibir o estresse oxidativo e reduzir os danos ocasionados pela peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides (Jobim et al., 2003). A Spermadhesin 1 atua como um fator de desativação da motilidade dos gametas masculinos estocados nas ampolas dos ductos deferentes antes da ejaculação, evitando assim o consumo de energia (Kumar et al., 2012; Codognoto et al., 2018). Tais funções podem ter contribuído para que os espermatozoides dos touros classificados como aptos à reprodução tenham apresentado maior motilidade espermática (embora não significativa) e menor percentagem de defeitos espermáticos em relação aos touros classificados como inaptos à reprodução.

A BSP PDC-109 é uma proteína glicosilada de baixo peso molecular e a mais abundante de todas as BSP, contém dois domínios de fibronectina tipo II que permitem a união específica à fosfatidilcolina da membrana dos espermatozoides (Sankhala e Swamy, 2010). Durante a ejaculação, a BSP PDC-109 liga-se à membrana das células espermáticas e induz a saída de colesterol e fosfolipídios como mecanismo de indução da capacitação (Viana et al., 2018). Nos órgãos reprodutivos femininos, esta proteína participa da união dos espermatozoides ao epitélio do oviduto e mantém a saída de colesterol da membrana em presença de LDL e glicosaminoglicanos (Suarez, 2016). Em virtude disso, as BSP PDC-109 estabiliza as membranas e melhora as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário in vitro (Rodriguez-Villamil et al., 2016).

Viana et al. (2018) identificaram a BSP PDC-109 como uma das proteínas mais abundantes em touros da raça Holandês com alta fertilidade. Segundo Menezes et al. (2017), esta proteína apresenta associações positivas com a motilidade de espermatozoides bovinos

criopreservados devido à sua capacidade de auxiliar no dobramento, transporte e montagem de proteínas em complexos e o controle dos fatores de estresse gerados pela criopreservação (Sankhala e Swamy, et al. 2010).

A Serine protease inhibitor clade E member, é uma proteína com atividade antiprotease específica das proteases de serina, sintetizada em uma grande variedade de tecidos incluindo os órgãos reprodutivos. Alguns autores (Lu et al., 2011), têm demonstrado a capacidade da Serine protease inhibitor clade E member como fator decapacitante em espermatozoides de camundongos, mediante o bloqueio do efluxo de colesterol das membranas plasmáticas das células espermáticas, diminuição na entrada de cálcio e a supressão do aumento de fosforilação da tirosina dos espermatozoides, evitando a capacitação precoce e a reação acrossômica antes que as células alcancem o local da fertilização (Li et al., 2018).

De acordo com os termos de ontologia gênica, as proteínas foram distribuídas em 21 classes, sendo as categorias hidrolases e moduladores enzimáticos as mais representativas, com 49 e 29 proteínas classificadas, respectivamente (Figura 6). Das 49 proteínas da categoria hidrolase, 59,2 % apresentaram atividade proteolítica e foram representadas por Serino-proteases (41,4 %), Cisteíno-proteases (24,1 %) e Metaloproteinases (27,6 %). Esta classificação mostra variedade e diversidade de proteínas envolvidas nos processos fisiológicos da reprodução animal e sua complexidade.

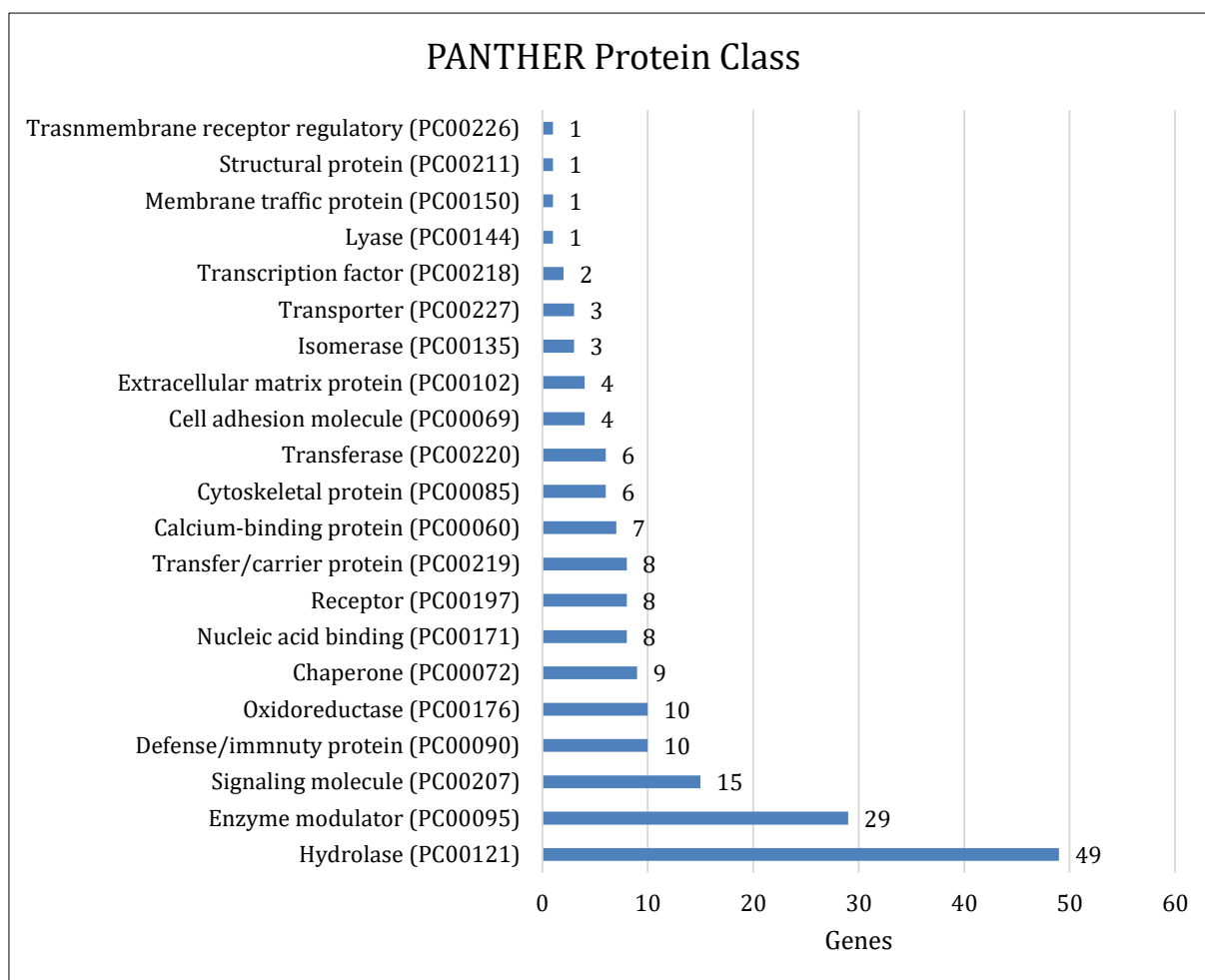


FIGURA 6: Classificação funcional das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução.

As proteínas do plasma seminal foram classificadas em 13 categorias segundo seus processos biológicos, sendo os processos celulares (94), metabólicos (85) e de resposta a estímulos (39) os grupos com maior número de proteínas classificadas (Figura 7). Estes resultados são similares parcialmente aos reportados por Westfalewicz et al. (2017) e Menezes et al. (2017), porém, devem ser considerados os números de proteínas identificadas em cada um dos trabalhos e os softwares usados para a classificação, por serem variáveis relacionadas à obtenção e interpretação dos resultados. Entretanto, somente, seis proteínas foram enquadradas no processo biológico relacionado com a reprodução, em que, 66,7 % estão relacionadas com a espermatogêneses (BSP PDC-109, BSP A3, BPS-30kDa, Epididymal sperm binding protein 1) e 33,3 % com a fertilização (ADAM metallopeptidase domain 9, ADAM metallopeptidase domain 15).

A Epididymal sperm binding protein 1 é uma proteína constituinte do fluido da cauda do epidídimo de característica lipofílica, que tem sido identificada no PS de touros das raças Holandês (Moura et al., 2010) e Brahman (Rêgo et al., 2014). Esta proteína se adere à superfície dos espermatozoides intactos e desempenha papel fundamental na maturação espermática. Por outro lado, tem sido reportada relações positivas entre a Epididymal sperm binding protein 1 e o efeito do PS sobre motilidade espermática em ovinos (Bernardini et al., 2011).

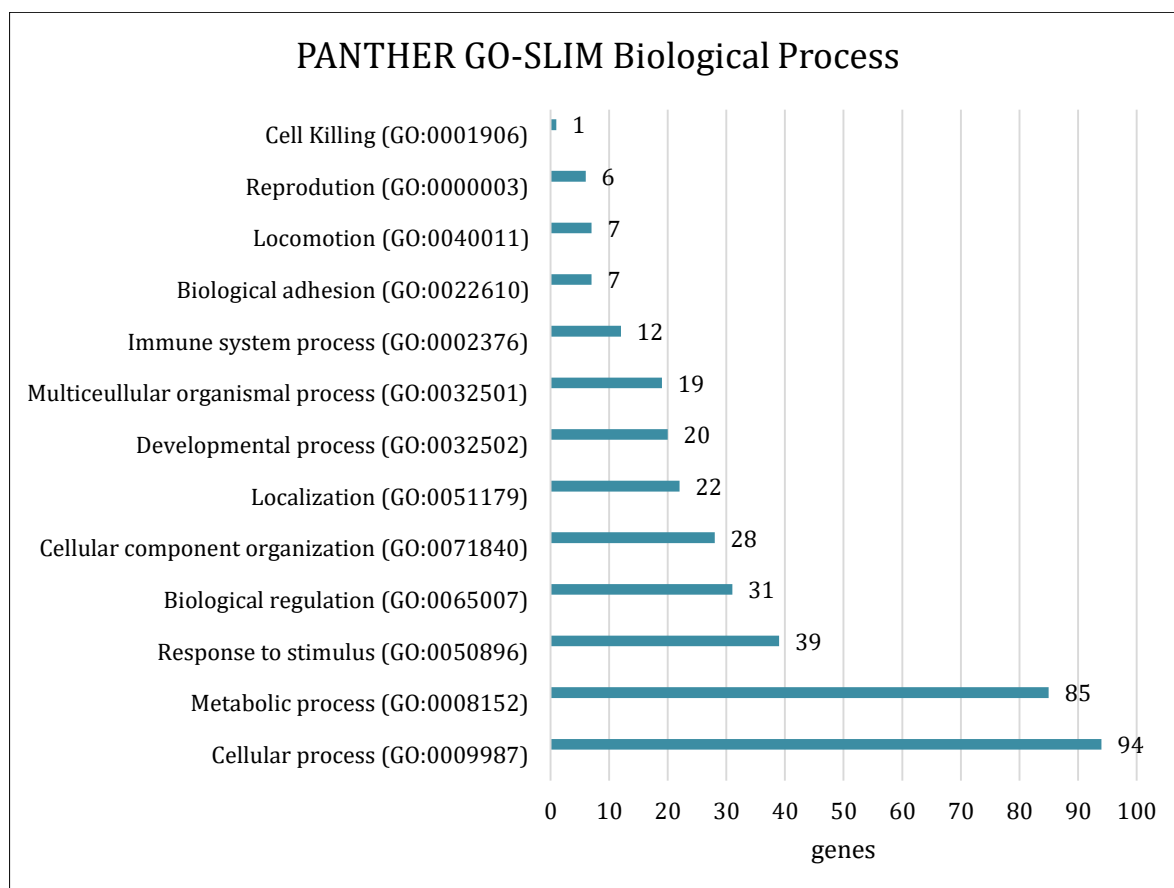


FIGURA 7: Classificação funcional das proteínas do plasma seminal de acordo com seus processos biológicos, anotadas no UniprotKB, de touros da raça Nelore entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução.

Das proteínas agrupadas na classe de processo celular, 60,6 % estão vinculadas com a comunicação celular, 16,8 % com o movimento celular, 10,4 % com o ciclo celular, 5,3 % estão relacionadas com o crescimento e reconhecimento celular e 2,1 % com a proliferação celular (Figura8).

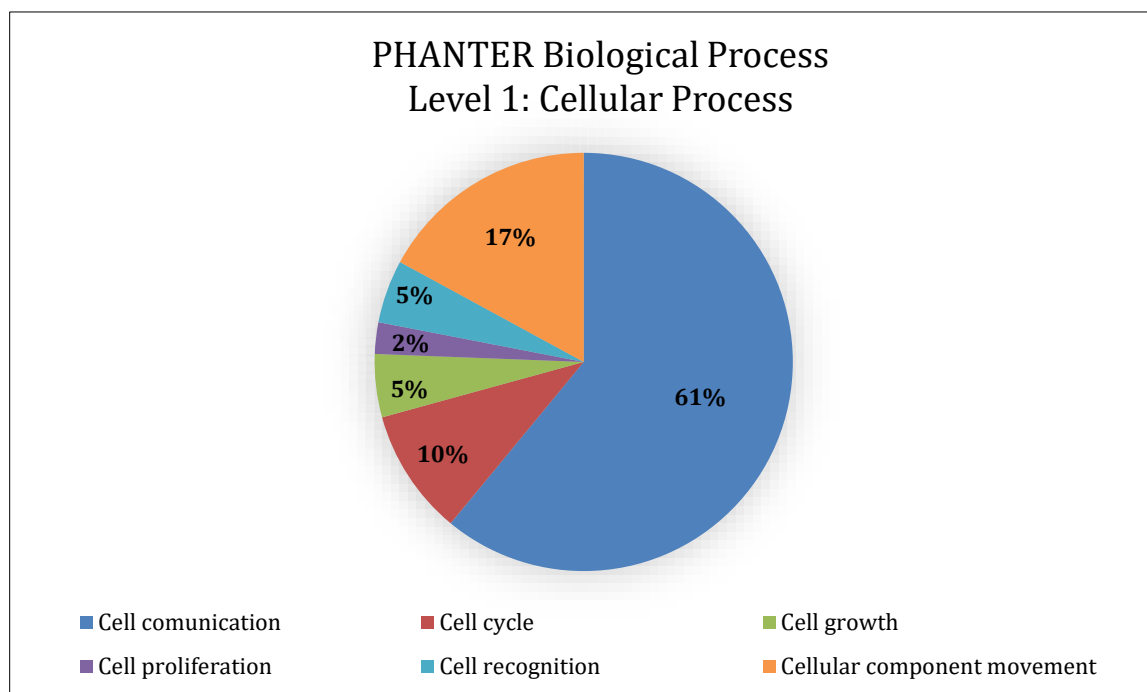


FIGURA 8: Classificação das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 e 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução, enquadradas no sub-processo Cellular Process.

Contudo, as proteínas identificadas pelo o MASCOT como não caracterizadas foram identificadas realizando-se um alinhamento de sequências de aminoácidos por meio do algoritmo BLASTp (Tabela 6). Assim, foram recuperadas dez proteínas, as quais em sua maioria estão relacionadas com a resposta imune, ativação do sistema de complemento e o remodelamento tissular da matriz extracelular.

TABELA 6: BLASTp das proteínas do plasma seminal bovino identificadas no banco de dados UniProt KB como não caracterizadas

Protein Access Uniprot	Protein Access NCBI	Protein Name	Max Score	Query Cover	e-value	Identificação
L8I2G8	XP_024840291	Ovalbumin	369	84%	4e-127	97%
G3N0V0	AQT27059	Immunoglobulin gama heavy chain	667	100%	0.0	98%
E1BH06	DAA16335	TPA: complement C4	3588	100%	0.0	100%
G3MWX7	XP_010808932	Epididymal-specific lipocalin-5	227	100%	0.0	100%
G3MX67	XP_010806841	Protein LEG1 homolog	647	100%	0.0	98%
G5E604	AAB66569	Immunoglobulin light chain variable region	198	92%	1e-69	100%
G5E5T5	ANN46370	Membrane-bound immunoglobulin mu2 heavy chain constant region	547	99%	0.0	81%
F1MLW8	XP_024833614	Immunoglobulin lambda-1 light chain-like isoform X5	455	100%	9e-165	98%
F1MY12	XP_024834626	Metalloproteinase inhibitor 1-like	419	96%	2e-151	100%
G3N2D8	DAA20447	TPA: gamma-glutamyltransferase 1-lik	1165	100%	0.0	100%

De acordo com a quantificação da abundância relativa das proteínas (Label-free proteomics, emPAI), identificadas no plasma seminal de touros classificados como aptos e inaptos à reprodução, 34 proteínas foram diferencialmente abundantes em ambos os grupos de animais (Figura 9). Entre elas, 26 proteínas apresentaram maior abundância no grupo de touros aptos à reprodução (POOL 1: R1, R3, R4) e oito no grupo de touros classificados como inaptos à reprodução (POOL 2: R1, R3, R4; Tabela 7). As proteínas com maior abundância nos touros inaptos estão relacionadas com a adesão celular, metabolismo energético da glicose e sua relação com a motilidade espermática.

Dentre as proteínas com maior abundância no grupo dos touros classificados como aptos à reprodução, algumas apresentaram relação direta com a ativação do sistema do complemento (Complement factor B, Complement C3). O complemento é um componente central da imunidade inata do organismo que está presente no plasma sanguíneo e outros líquidos biológicos como muco cervical, secreções endometriais, fluido folicular e plasma seminal (Harris et al., 2006).

A ativação do complemento no PS contribui na seleção dos espermatozoides com as características mais apropriadas para a fertilização por meio da fagocitose de espermatozoides

mortos, com defeitos espermáticos ou imóveis (Rêgo et al., 2014). Assim como, ativação do sistema de complemento nos espermatozoides está relacionada a eventos fisiológicos como a reação acrossômica e a união entre as células espermáticas e o ovócito, por meio da união mediada pela Complement C3 entre o regulador CD46 do acrossoma dos espermatozoides e seu homólogo no ovócito (Dorus et al., 2012).

TABELA 7: Proteínas diferencialmente abundantes em plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 a 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução

ID Protein	Name	Touros Aptos	Touros Inaptos
G5E5M8	Alpha-mannosidase	Up	
D4QBD1	Hemoglin Beta		Up
P17697	Clusterin	Up	
L8HPF5	Ig Gamma-1 chain	Up	
D4QBC5	Hemoglin Beta	Up	
P63103	14-3-3 Protein Zeta/Delta	Up	
Q29451	Lysosomal alpha-mannosidase	Up	
A5PKI3	Protein FAM3C		Up
Q76LV2	Heat shock protein HSP 90-alpha	Up	
P81187	Complement factor B	Up	
Q0VD19	Sphingomyelin phosphodiesterase	Up	
A5D984	Pyruvate kinase	Up	
Q7SIH1	Alpha-2-macroglobulin	Up	
W5P198	Vasoactive intestinal peptide		Up
Q3ZCI9	T-complex protein 1 subunit theta	Up	
Q2UVX4	Complement C3	Up	
P81134	Renin receptor	Up	
E1BQ21	Family with sequence similarity 3 member B		Up
Q3ZBZ1	45 kDa calcium-binding protein	Up	
P29392	Spermadhesin-1	Up	
L8IQM7	Vitamin K-dependent protein S	Up	
E1BH06	TPA: complement C4	Up	
Q17QR9	Testican 1	Up	
P81425	Dipeptidyl peptidase 4		Up
Q9BGU5	Cathepsin D	Up	
A2I7N1	Serpin A3-5	Up	
P81265	Polymeric immunoglobulin receptor		Up
Q3ZBM0	A proliferation-inducing ligand		Up
Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	Up	
E1BHP0	Alpha-mannosidase	Up	
Q3T010	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4		Up
Q3ZBH0	T-complex protein 1 subunit beta	Up	
Q1JPB0	Leukocyte elastase inhibitor	Up	

Outra proteína diferencialmente abundante foi a Clusterin, que participa na proteção dos espermatozoides e é secretada em resposta ao dano celular e ao choque térmico. A Clusterin atua como uma chaperona, blindando as células contra a precipitação de proteínas e do ataque do sistema imunitário mediado pelo complemento (Boe-Hanse et al., 2015). Em homens, a Clusterin auxilia na eliminação das células espermáticas defeituosas no epidídimo (Zalata et al., 2012), e segundo Saadi et al. (2013), a Clusterin é um indicador de baixa qualidade espermática ao estar relacionada com o aumento de espermatozoides morfologicamente anormais em touros.

Contrário a estas observações, no presente estudo a Clusterin foi mais abundante no grupo de touros com baixo percentual de patológicas espermáticas (touros aptos à reprodução). Este fato pode estar relacionado ao papel da Clusterin como inibidor do complemento no PS para manter o equilíbrio entre a eliminação de espermatozoides inviáveis e o número de células espermáticas necessárias para garantir a fertilização (Bailey et al., 2002). Além disso, Menezes et al. (2017) reportaram associações positivas entre isoformas de Clusterin e a motilidade e vigor espermático, assim como, com espermatozoides com acrossoma intacto, atribuindo essa associação ao papel antioxidante da Clusterin que é capaz de proteger as células espermáticas da apoptose induzida pelo excesso de ROS. Observação que pode ser aplicado no presente estudo, devido às similaridades entre os resultados das duas pesquisas.

A ação de proteção da Clusterin é reforçada pela T-Complex Protein e a Lactoferrin proteínas diferencialmente abundantes no grupo de touros classificados como aptos à reprodução que atuam como chaperonas e protegem aos espermatozoides da precipitação de proteínas e do excesso de fagocitoses mediado pelo complemento e aos radicais livres produtos do metabolismo de ferro (Rêgo et al., 2015).

A imunoglobulina G é a molécula principal do sistema imunitário e antigamente acreditava-se que era produzida exclusivamente pelos linfócitos B diferenciados. Estudos recentes verificaram a presença desta molécula em espermatozoides humanos estando relacionada com a união entre os gametas masculinos e femininos (Yan et al., 2016). González-Cadavid et al. (2014) identificaram a imunoglobulina G no plasma seminal de varrões adultos saudáveis e observaram correlação negativa desta proteína com defeitos da peça intermediária e cauda espermática. No entanto, a imunoglobulina G foi associada com a subfertilidade autoimune em homens, devido à formação de auto-anticorpos contra os espermatozoides

(Brazvdova et al., 2016), que promoviam a aglutinação e imobilização das células espermáticas evitando a penetração no muco cervical e a interação com o ovócito.

No presente estudo a Ig Gamma-1 chain, foi diferencialmente abundante no grupo de touros classificados como aptos à reprodução, informação que se supõe ser uma novidade, devido a poucos trabalhos relatando o papel benéfico desta proteína sobre os espermatozoides bovinos e sua identificação no PS, porém, serão necessários outros testes para validar biologicamente o resultado do presente estudo.

A Cathepsin D é uma protease aspártica lisossomal produzida nas células somáticas dos testículos e epidídimos envolvida na maturação espermática por meio de modificações de algumas proteínas da membrana dos espermatozoides durante o trânsito epididimário (Moura et al., 2010; Saewu et al., 2012). Esta proteína é sintetizada e secretada pelas células principais da cabeça do epidídimo e transportada à superfície dos espermatozoides por meio de epididimossomos (Asubapoongpatana et al., 2013). A Cathepsin D está relacionada com a degradação de proteínas da matriz extracelular vaginal (Brazdova et al., 2016) e tem sido identificada em fluido epididimário de touros de alta fertilidade (Moura et al., 2006). Esta observação coincide com os achados do presente estudo onde a Cathepsin D foi diferencialmente abundante no grupo de touros com maior número de espermatozoides móveis e menor percentagem de defeitos espermáticos.

Semelhante à Cathepsin D, a 14-3-3 Protein Zeta/Delta é uma molécula produzida nos epidídimos, que participa na síntese e transporte de proteínas e atua como canal na interação entre os espermatozoides e macromoléculas, desempenhando papel importante na espermatogênese e espermição (Codognoto et al., 2018). A 14-3-3 Protein Zeta/Delta participa em várias etapas da maturação espermática e desenvolvimento da motilidade dos espermatozoides nos epidídimos, e segundo Huang et al. (2015) apresenta associações com espermatozoides de búfalos com alta motilidade espermática e fertilidade, devido à sua capacidade de regular a ação inibitória da protein phosphatase 1, na cauda dos espermatozoides.

A Tubulin beta-4B chain é um membro da superfamília das tubulinas que são um componente dos microtubulos do axonema do flagelo dos espermatozoides (Hu et al., 2017). As tubilinas consistem de um heterodímero de alfa-tubulin e beta-tubulin, que participam no início e na manutenção da motilidade espermática (Horokhovatskyi et al., 2018). A alfa e beta-tubulin experimentam várias modificações pós-traducionais, as quais desempenham funções nos microtúbulos relacionadas com a estabilidade e a interação entre os microtúbulos e outras proteínas associadas (Parab et al., 2015). Alguns estudos em ratos e humanos têm observado

diferenças na abundância das tubulinas em ejaculados com alta e baixa motilidade espermática, sendo mais abundante nos espermatozoides com maior motilidade e menor alteração da peça intermediária (Shen et al., 2013; Hong et al., 2014). O que explicaria seu papel no PS do grupo de touros aptos à reprodução.

A protein Family with sequence similarity 3 member C (FAM3C) e a Family with sequence similarity 3 member B (FAM3B), são proteínas similares a citocinas, pertencentes à família FAM3 (família com similitude na sequência 3), sintetizadas e secretadas pelo fígado e pâncreas desempenhando papel importante no metabolismo da glicose e lipídios (Bendre et al., 2017). A FAM3B é ativada pelos ácidos graxos livres e citocinas pró-inflamatórias, e atua como um regulador negativo da glicose, ao induzir a apoptose em células beta secretoras de insulina, por meio do aumento das caspases e da resistência à insulina nos tecidos periféricos (Wang et al., 2018; Zhang et al., 2018). Por sua vez, a FAM3C melhora a resistência à insulina hepática e diminui a hiperglicemia por meio da ativação do fator de choque térmico 1, que induz a expressão do gene CALM1 e aumenta a concentração da proteína calmodulina a qual finalmente, suprimirá a produção da glicose ao induzir a ativação do receptor Akt nos hepatócitos (Chen et al., 2017). Segundo Rêgo et al. (2015), a FAM3C pode ser expressada no PS como resposta ao dano celular induzido pelo aumento nas concentrações de cobre.

Estas moléculas são alvo de muitos estudos relacionados com seu papel em doenças metabólicas, porém, foram encontrados poucos trabalhos explicando seu papel no plasma seminal. Considerando as informações disponíveis e relacionando o fato que estas duas proteínas foram diferencialmente abundantes no PS dos touros classificados como inaptos à reprodução, podemos supor que a FAM3C e FAM3B estão envolvidas em mecanismos relacionados à incapacidade dos espermatozoides de utilizar os substratos energéticos do PS, importantes em vários processos fisiológicos como a motilidade espermática e sua tentativa de reestabelecer essa condição. Porém, semelhante ao caso da imunoglobulina G, serão necessários outros estudos para validar esta hipótese.

A hipótese anterior pode ser reforçada devido ao fato da Vasoactive intestinal peptide (VIP), um neuropeptídeo envolvido na geração de energia, também apresentou maior abundância no grupo dos touros inaptos à reprodução (Valiente et al., 2008). Esta proteína tem sido relacionada com a motilidade espermática rápida e de curta duração, apresentada pelos espermatozoides em algumas condições como em contato com o fluido folicular, onde também está presente o VIP. Os mecanismos pelos quais esta proteína aumenta a motilidade não estão totalmente esclarecidos, mas Siow et al. (1999) acreditam que esteja relacionado ao papel do

VIP como ativador a adenilato ciclase, que por sua vez, eleva as concentrações intracelulares de cAMP e ativa a proteína kinase, a qual é importante na fosforilação proteica.

Baseados no mecanismo de ação do VIP sobre os espermatozoides, entende-se que a diferença de abundância desta proteína no grupo de touros classificados como inaptos à reprodução pode constituir num mecanismo de compensação do organismo para tentar equilibrar a alta percentagem de espermatozoides defeituosos, apresentando células espermáticas mais rápidas para garantir a fertilidade. Além de estabelecer uma alternativa as alterações metabólicas geradas pela alta concentração de potássio no PS e a expressão da FAM3B (Wilson et al., 2010; Bolanca et al., 2016).

A Polymeric immunoglobulin receptor é uma proteína transmembranar produzida pelas células epiteliais da protasta e as glândulas uretrais, essa proteína atua como precursor da imunoglobulina A secretora, que por sua vez atua como uma defesa imune específica de antígenos contra patógenos que a mucosa está comumente exposta (Menezes et al., 2017). Segundo Cunningham et al. 2008, a Polymeric immunoglobulin receptor medeia a translocação da imunoglobulina A no sistema reprodutor masculino. Rêgo et al. 2014, acreditam que a Polymeric immunoglobulin receptor forma parte da linha de defesa do trato reprodutivo masculino junto a proteínas como Clusterin e Complement factor B contra agentes infecciosos.

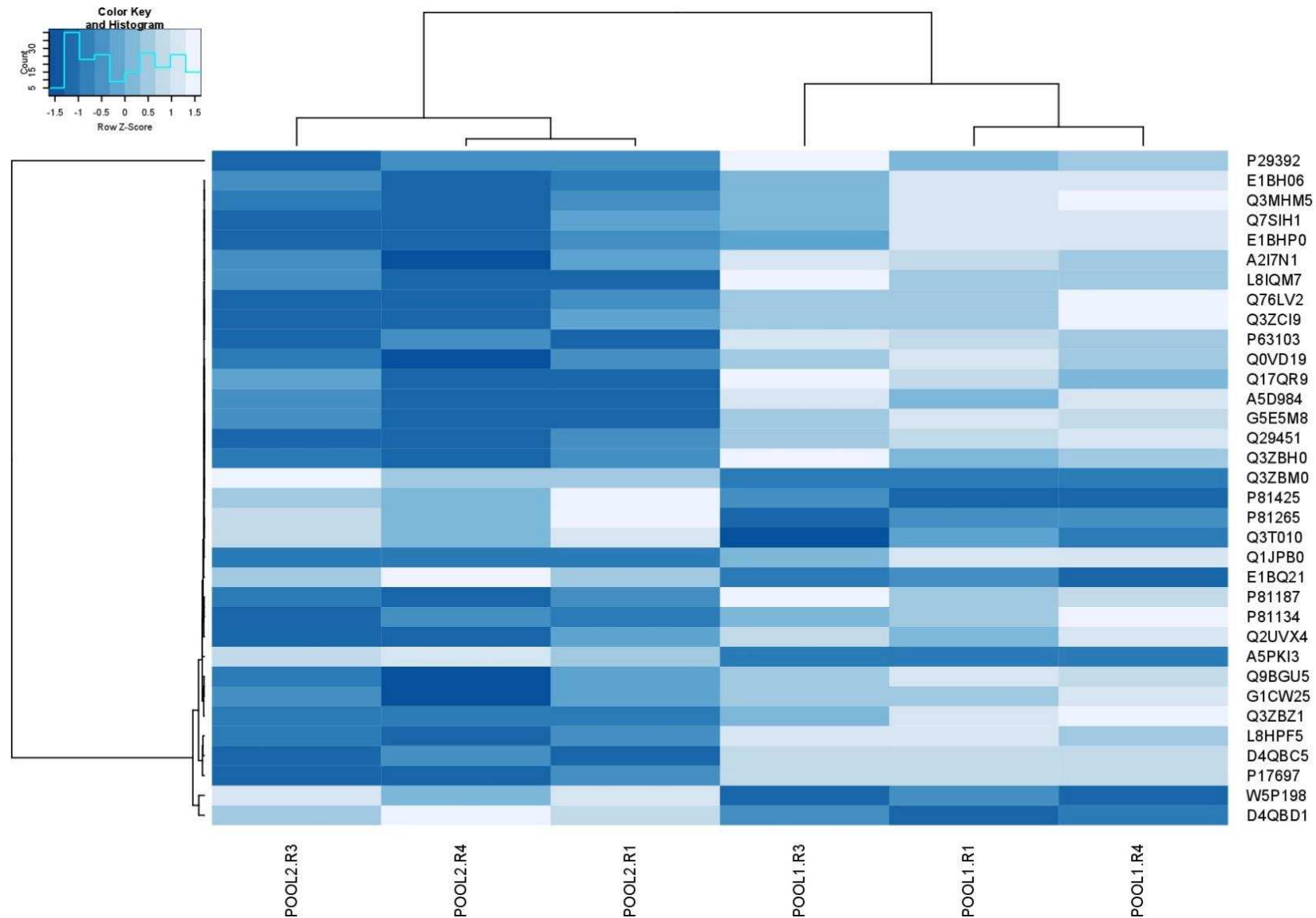


FIGURA 9: HeatMap das proteínas diferencialmente abundantes do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 18 e 21 meses de idade classificados como aptos e inapto à reprodução.

As redes de interação das proteínas do plasma seminal identificadas por meio de LC-MS/MS são apresentadas na Figura 10. Em termos gerais, as proteínas identificadas apresentaram associações com 17 vias relacionadas com o metabolismo celular, a resposta imune, o sistema de complemento, entre outras. A Albumina parece desempenhar papel-chave ao atuar como ponte de união entre as proteínas envolvidas na via da glicólise/gliconeogênese (nodos vermelhos), a via do complemento e coagulação (nodos azuis), e a via relacionada com o processamento e apresentação de antígenos (nodos amarelos).

Algumas redes compartilham vias metabólicas, como observado no subconjunto dois, em que as proteínas relacionaram-se com a via do processamento de proteínas no retículo endoplasmático (nodos roxos escuros), a via de sinalização do estrógeno (nodos azuis celestes), fagossomos (nodos verdes escuros) e processamento e apresentação de antígenos (nodos amarelos). Também foi evidenciado um vínculo entre as proteínas envolvidas na via metabólica dos lisossomos (nodos verdes) e outras vias metabólicas gerais (nodos roxos) (subconjunto 4).

A Albumina (ALB) é a proteína principal do plasma sanguíneo e participa na regulação osmótica e na ligação diferentes moléculas, íons e hormônios. No PS, estimula a saída de colesterol das membranas espermáticas e coestimula a capacitação e reação acrossômica. Além de atuar como inibidor natural do sistema de complemento nos espermatozoides.

Como mencionado anteriormente, o sistema de complemento é uma parte central da imunidade inata que serve como uma primeira linha de defesa contra células hospedeiras estranhas ou alteradas (Noris e Remuzzi, 2013). Este sistema é composto de proteínas plasmáticas produzidas no fígado ou proteínas de membrana expressas na superfície celular (Merle et al., 2015). O complemento pode ser ativado por três vias distintas (via clássica, lectina e via alternativa), cada uma levando a uma via terminal comum (Elvington et al., 2016).

Nos órgãos do sistema reprodutivo, as proteínas ativadoras do complemento do PS interagem com as células epiteliais do endométrio, induzindo ou suprimindo a tradução de alguns mRNA (Robertson et al., 2016). Esse evento estimula a síntese de citocinas e quimiocinas que recrutam células imunológicas do sangue para a luz endometrial por meio de anafilotoxinas as quais fagocitam espermatozoides não compatíveis com a fertilidade e limpam o ambiente endometrial, promovendo a receptividade embrionária (Schjenken et al., 2015).

O papel do complemento na fertilidade depende do equilíbrio entre os factores ativadores do sistema e o mecanismo de regulação e inibição do mesmo encontradas no PS e nos espermatozoides. A Albumina, a Clusterin e a lactoferrin são proteínas multifuncionais que

protegem aos espermatozoides viáveis do ataque do sistema de complemento (Rêgo et al., 2015; Viana et al., 2018).

Na via da glicose a albumina interage por meio da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD) com outras enzimas como a alfa enolase (ENO1) e piruvato kinase que participam nas vias da glicólise e da gliconeogênese como catalizadores de metabolitos secundários no processo de geração de energia (Broetto, 2010). Os espermatozoides à semelhança do que ocorre em toda célula viva, requer energia para seu desenvolvimento e função, utilizando ATP como combustível em processos celulares como a motilidade, capacitação espermática, hiperativação e reação acrossômica (Mannowet et al., 2012).

O ATP nos espermatozoides é formado por meio de duas vias metabólicas, a glicólise e a fosforilação oxidativa (Mukai e Travis, 2012). A glicólise que envolve a quebra de monossacarídeos de carbono durante uma serie de reações catalisadas por enzimas glicólicas como GAPD, ocorre na cabeça e a cauda nos espermatozoides, regiões anatômicas desprovidas de enzimas respiratórias (Plessis et al., 2015).

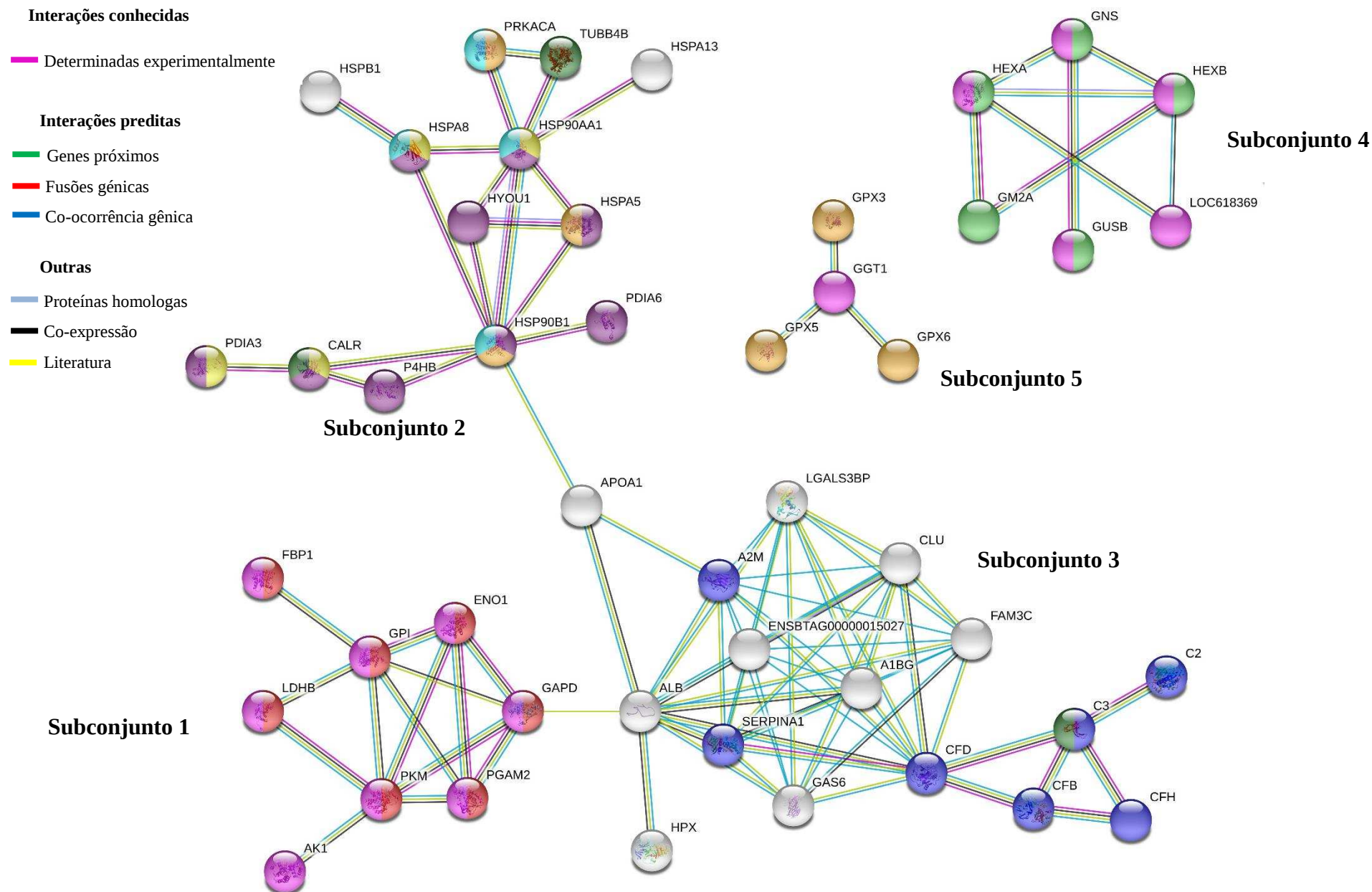


FIGURA 10: Redes de interação das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 18 e 21 meses de idade classificados como aptos e inaptos à reprodução, obtidas por meio do Software STRING 10.5

6. CONCLUSÕES

- O perfil bioquímico do plasma seminal parece não ter um efeito sobre as características físicas e morfológicas dos ejaculados de touros jovens da raça Nelore, classificados como aptos e inaptos à reprodução;
- A análise do plasma seminal por LC-MS/MS permitiu a identificação de 298 proteínas, das quais 34 foram diferencialmente abundantes dentre os dois grupos de animais estudados. As proteínas mais abundantes no grupo de touros classificados como aptos à reprodução estavam relacionadas a diferentes características que favorecem a fertilização, enquanto, aquelas mais abundantes no grupo de touros inaptos parecem constituir mecanismos de compensação para tentar suprir o alto número de espermatozoides com defeitos espermáticos;
- A classificação por ontologia gênica permitiu confirmar a diversidade funcional das proteínas de plasma seminal de touros jovens da raça Nelore;
- Devido à sua diversidade as proteínas formaram parte de várias vias metabólicas relacionadas com a geração de energia metabólica e a seleção dos espermatozoides com as melhores características morfofuncionais.

7. REFERENCIAS.

ABDEL-RAHMAN, H.; EL-BELEY, M.; AL-QARAWI, A.; EL-MOUGY, S. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. **Small Ruminant Research**, v.38, n.1, p.45-49, 2000.

AGARWAL, A.; BERTOLLA, R.; SAMANTA, L. Sperm proteomics: potential impact on male infertility treatment. **Expert Review of Proteomics**, v.13, n.3, p.285-296, 2016.

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; PLESSIS, S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, n.112, 2014a.

AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; PLESSIS, S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v.31, n.1, p.1-17, 2014b.

AHMADI, S.; BASHIRI, R.; ANARI, A.; NADJARZADEH, A. Antioxidant supplements and semen parameters: an evidence based review. **International Journal of Reproductive Biomedicine**, v.14, n.12, p.729-736, 2016.

AITKEN, R.; GIBB, Z.; BAKER, M.; DREVET, J. GHARAGOZLOO, P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, n.2, p.1-10, 2016.

ALTSCHUL, S.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

APIECHELA, S.; ARGANARAZ, M.; GUILIANO, S. ZAMPINI, R.; CARRETO, I.; MIRAGAYA, M.; MICELI, D. Llama oviductal sperm reservoirs: involvement of bulbourethral glands. **Andrologia**, v.46, n.3, p.290-295, 2014.

ARRUDA, R.; CELEGHINI, E.; GARCIA, A.; SANTOS, G.; LEITE, T.; OLIVEIRA, L.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.47-60, 2015.

ASADPOUR, R. Relationship between mineral composition of seminal plasma and semen quality in various ram breeds. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.2, p.1027, 2012.

ASUVAPONGPATANA, S.; SAEWU, A.; CHOTWIWATTHANAKUN, C.; VANICHVIRIYAKIT, R.; WEERACHATYANUKUL, W. Localization of cathepsin D in mouse reproductive tissues and its acquisition onto sperm Surface during epididymal sperm maturation, **Acta Histochemica**, v.115, n.5, p.425-433, 2013.

ASSUMPÇÃO, T.; FONTES, W.; SOUSA, M.; RICART, C. Proteome analysis of nelore bull (*Bos taurus indicus*) seminal plasma. **Protein and Peptide Letters**, v.12, n.8, p.813-817, 2005.

ATING, F.; KERKNI, A.; SAAD, A.; AJINA, M; Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of tunisian infertile men. **Journal of Assited Reproduction and Genetics**, v, 34, n.3, p.373-381, 2017.

ATTAMAN, J.; TOTH, T.; FURTADO, J.; CAMPOS, H.; HAUSER, R.; CHAVARRO, J. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. **Human Reproduction**, v.27, n.5, p.1466-1474, 2012.

BAILEY, R.; ARONOW, B.; HARMOY, J.; GISWOLD, M. Heat shock-initiated apoptpsis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out nice. **Biology of Reproduction**, v.66, n.4, p.1042-1053, 2002.

BANJOKO, S.; ADESEOLU, F. Seminal plasma ph, inorganic phospate, total and ionized calcium concentrations in the assessment of human spermatozoa function. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, n.11, p.2483-2486, 2013.

BANSAL, A.; BILASPURI, G. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v.2011, p.e686137, 2011.

BEER-LJUBIC, B.; ALADROVIC, J.; MARENJAK, T.; LASKAJ, R.; MAJIC, I.; MILINKOVIC, S. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tools for quality semen evaluation. **Theriogenology**, v.72, n.8, p.1132-1140, 2009.

BENDRE, A.; BUKI K.; MAATTA, A. Fam3c modulates osteogenic differentiation by down-regulating runx2. **Differentiation**, v.93, p.50-57, 2017.

BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; FORNÉS, M.; ALBEIRO, R.; CESARI, A. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, v.76, n.3, p.436-447, 2011.

BERNARDINO, R.; JESUS, T.; MARTINS, A.; SOUSA, M.; BARROS, A.; CAVACO, J.; SOCORRO, S.; ALVES, M.; OLIVEIRA, P. Molecular basis of bicarbonate membrane transport in male reproductive tract. **Current Medicinal Chemistry**, v.20, n.32, p.4037-4049, 2013.

BERNARDINO, R.; COSTA, A.; MARTINS, A.; SILVA, J.; BARROS, A.; SOUSA, M.; SÁ, R.; ALVES, M.; OLIVEIRA, P. Estradiol modulates Na⁺-dependent HCO₃⁻-transporters altering intracellular pH and ion transport in human sertoli cells: a role on male fertility? **Biology of the Cell**, v.108, n.7, p.179-188, 2016.

BEZERRA, L. **Análise bioquímica e proteômica do plasma seminal equino e sua relação com a criopreservação do sêmen**. 2015, 125 f. Teses de Doutorado – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

BOE-HANSEN, G.; RÊGO, J.; CRISP, J.; MOURA, A.; NOUWENS, A.; LI, Y.; VENUS, B.; BURNS, B.; MCGOWAN, M. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old brahman (*Bos indicus*) bulls. **Animal Reproduction Science**, v.162, p.20-30, 2015.

BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs and in semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark. **Nordisk Veterinaermedicin**, v.35, p.105-130, 1973.

BOLANCA, I.; OBHODAS, J.; LJILJAK, D.; MATJACIC, L.; KUNA, K. Synergetic effects of K, Ca, Cu and Zn in human semen in relation to parameters indicative of spontaneous hyperactivation of spermatozoa. **Plos One**, v.11, n.3, p.e0152445, 2016.

BOULEFTOUR, W.; JUIGNWT, L.; BOUET, G.; GRANITO, R.; VANDEN, A.; LAROCHE, N.; AUBIN, J.; LAFAGE, M.; VICO, L.; MALAVAL, L. The role of sibling, bone sialoprotein in skeletal biology: contribution of mouse experimental genetics. **Matrix Biology**, v.52, p.60-77, 2016.

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

BRAZDOVA, A.; SENECHAL, H.; PELTRE, G.; PONCET, P. Immune aspects of female infertility, **International Journal of Fertility and Sterility**, v.10, n.1, p.1-10, 2016.

BROETTO, L. **Caracterização funcional da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase na superfície celular do entomopatógeno *Atherhizium anisopliae***. 2010, 90 f. Teses de Doutorado – Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

CAMARGO, M.; INTASQUI, P.; PIMENTA, R. Understanding the seminal plasma proteome and its role in male fertility. **Basic and Clinical Andrology**, v.28, n.6, p.1-12, 2018.

CALVETE, J.; CARRERA, E.; SANZ, L.; TÖFFER, E. Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. **Biological Chemistry**, v.337, n.7, p. 521-527, 1996.

ÇEVIK, M.; TUNCER, P.; TASDEMIR, U.; ÖZGÜRTAS, T. Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoastozoospermic bulls of two breeds. **Turkish Journal Veterinary and Animal Sciences**, v.31, n.6, p.381-387, 2007.

CHEN, Q.; PENG, H.; LEI, L.; ZHANG, L.; KUANG, H.; CAO, Y.; SHI, Q.; MA, T.; DUAN, E. Aquaporin 3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration. **Cell Research**, v.21, n.6, p.922-933, 2011.

CHEN, Z.; WANG, J.; YANG, W.; CHEN, J.; MENG, Y.; FENG, B.; CHI, Y.; GENG, B.; ZHOU, Y.; CUI, Q.; YANG, J. FAM3C activates hsf1 to suppress hepatic gluconeogenesis and attenuate hyperglycemia of type 1 diabetic mice. **Oncotarget**, v.8, n.62, p.106038-106049, 2017.

CODOGNATO, V.; YAMADA, P.; SCHMITH, R.; RYDYGIER, F.; SCOTT, C.; LAINETTI, P.; BROCHINE, S.; DELL'AQUA, C.; SOUZA, F.; OBA, E. Functional insights into the role of seminal plasma proteins on sperm motility of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 195, p. 251-258, 2018.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte, 2013, p.87

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte, 1998, p.49.

CORREA, J.; IRAL, R.; ROJAS, L. Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad de varianza. **Revista Colombiana de Estadística**, v.29, n.1, p.57-76, 2006.

CRISÓSTOMO, B.; SILVA, L.; MURTA, D.; REBELLO, R.; BARRETO, S.; BARBOSA, L.; XAVIER, D.; RODRIGUES, L.; RIBEIRO, J. Perfil espermático de touros da raça Sindi. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.10, n.1, p.163-167, 2016.

CRISÓSTOMO, L.; ALVES, M.; CALAMITA, G.; SOUSA, M.; OLIVEIRA, P. Glycerol and testicular activity: the good, the bad and the ugly. **Molecular Human Reproduction**, v.23, n.11, p.724-737, 2017.

D'CRUZ, O. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v.1, p.161-176, 1996.

DE ASSUMPÇÃO, T.; YONEYAMA, A.; PALLAORO, R.; KITAGAWA, C.; ALBERTON, C. Perfil de proteínas e açúcares do plasma seminal e sua relação com os parâmetros andrológicos de touros da raça Nelore. **Bioscience Journal**, v.29, n.4, p.940-945, 2013.

DOBRAKOWSKI, M.; KALETKA, Z.; GRECKA, A.; KASPERCZYK, S.; HORAK, S.; BIRKNER, E.; FIOLKA, J.; JASPERCZYK, A. The role of oxidative stress, selected metals, and parameters of the immune system in male fertility. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

DOBRAKOWSKI, M.; ZALEJSKA, J.; WIELKOSZYNSKI, T.; SWIETOCHOWSKA, KASPERCZYK, S. The effect of occupational exposure to lead on the non-enzymatic antioxidante system. **Medycyna Pracy**, v.65, n.4, p.443-451, 2014.

DORUS, S.; SKERGET, S.; KARR, T.; Proteomic Discovery of diverse immunity molecules in mammalian spermatozoa. **System Biology in Reproductive Medicine**, v.58, n.4, p.218-228, 2012.

ELVINGTON, M. LISZEWSKI, M.; ATKINSON, J. Evolution of the complement system: from defense in the single cell to guardian of the intravascular space. **Immunological reviews**, v.274, n.1, p.9-15, 2016.

ERGÜN, A.; KÖSE, S., AYDOS, K.; ATA, A.; AVCI, A. Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and se hormones. **Archives of Andrology**, v.53, n.1, p.21-23, 2007.

ERIKSON, D.; WAY, A.; CHAPMAN, D. Detection of osteopontin in holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenate, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, v.133, n.5, p.909-917, 2007.

FLORES, C.; VILANOVA, L. Metabolismo espermático. **Gaceta de Ciencias Veterinarias**, v.20, n.1, p.23-32, 2015.

FRENEAU, G. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.160-170, 2011.

GARCÍA-VÁZQUEZ, F.; GADEA, J.; MATÁS, C.; HOLT, W. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. **Asian Journal of Andrology**, v.18, n.6, p.844-850, 2016.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J.; MORENO, F.; ANDRADE, T.; SANTOS, A.; MOTEIRO, A.; MOREIRA, R.; MOURA, A. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology**, v.82, n.5, p.697-707, 2014.

GUASTI, P.; MONTEIRO, G.; PAPA, F. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozóides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.169-180, 2012.

GWATHMEY, T.; IGNOTZ, G.; MUELLER, J.; MANJUNATH, P.; SUAREZ S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, v.75, n.4, p.501-507, 2006.

HAGIUDA, J.; ISHIKAWA, H.; FURUUCHI, T.; HANAWA, Y.; MARUMO, K. Relationship between dyslipidaemia and semen quality and serum sex hormone levels: an infertility study of 167 Japanese patients. **Andrologia**, v.46, n.2, p.131-135, 2014.

HAMPEL, M.; BLASCO, J.; MARTÍN, M.; Biomarkers and effects. In: BLASCO, J.; CHAPMAN, P.; CAMPANA, O.; HAMPEL, M. **Marine Ecotoxicology: Current knowledge and future issues**. Cadiz: Academic Press, 2017, cap.5, p.121-165.

HANCOCH, J. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v.76, n.3, p.84-97, 1956.

HARAMAYA, H.; MINAMI, K.; KISHIDA, K.; NODA, T. Protein biomarkers for male artificial insemination subfertility in bovine spermatozoa. **Reproductive Medicine and Biology**, v.16, n.2, p.89-98, 2017.

HARRIS, C.; MIZUNO, M.; MORGAN, P. Complement and complement regulators in the male reproductive system. **Molecular Immunology**, v.43, n.1, p.57-67, 2006.

HONG, Y.; YU, X.; ZHANG, H.; LIU, Y.; MIAO, G.; ZHAO, Q. Carbon ion irradiation induces reduction of beta-tubulin in sperm of pubertal mice. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.27, n.2, p.130-133, 2014.

HOROKHOVATSKYI, Y.; DIETRICH, M.; LEBEDA, L.; FEDOROV, P.; RODINA, M.; DZYUBA, B. Cryopreservation effects on a viable sperm sterlet (*Acipenser ruthenus*) subpopulation obtained by a percoll density gradient method. **Plos One**, v.13, n.8, p.e0202514, 2018.

HU, F.; XU, K.; ZHOU, Y.; WU, C.; WANG, S.; XIAO, DUAN, W. Different expression. Patterns of sperm motility-related genes in testis of diploid and tetraploid cyprinid fish. **Biology of Reproduction**, v. 96, n.4, p.907-920, 2017.

HUANG, Y.; FU, Q.; YANG, L.; GUAN, J.; PAN, H, CHEN, F.; LU, K.; ZHANG, M. Differences between high and low-motility buffalo sperm identified by comparative proteomics. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n.3, p.443-451, 2015.

JOBIM, M.; OBERST, E.; SALBEGO, C.; SOUZA, D.; WALD, V.; MATTOS, R. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrimalimada. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, n.1, p.21-30, 2003.

JOBIM, M.; OBERTS, E.; SALBEGO, C.; SOUZA, D.; WALD, V.; TRAMONTINA, F., MATTOS, R. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation whit semen freezability. **Theriogenology**, v.61, n.3, p.255-266, 2004.

JOIS, P.; PLANTE, G.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Functional characterization of the domains of the bovine binder of SPerm 5 (BSP5) protein. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.13, n.64, 2015.

JUYENA, N.; STELLETTA, C. Seminal plasma: na essential atribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.33, n.4, p.536-551, 2012.

KANWAL, M.; REHMAN, N.; AHMAD, N.; SAMAD, H.; REHMAN, Z.; AKHTARAND, S. Bulk cations and trace elements in the nili-ravi buffalo and crossbred cow bulls semen. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.2, p.302-305, 2000.

KARUNAKARAN, M.; DEVANATHAN, T. Evolution of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. **Journal of Applied Animal Research**, v.45, n.1, p.136-144, 2017.

KASPERCZYK, A.; DOBRAKOWSKI, M.; HORAK, S.; FIOLKA, J.; BIRKNER, E. The influence of macro and trace elements on sperm quality. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.30, p. 153-159, 2015.

KASPERCZYK, A.; DOBRAKOWSKI, M.; FIOLKA, J.; HORAK, S.; BIRKNER, E. Magnesium and selected parameters of the non-enzymatic antioxidant and immune system and oxidative stress intensity in the seminal plasma of fertile males. **Magnesium Research**, v.28, n.1, p.14-22, 2015.

KASVANDIK, S.; SILLASTE, G.; VELTHUT, A.; MIKELSAAR, A.; HALLAP, T.; PADRIK, P.; TENSON, T.; JAAKMA, U.; KÕKS, S.; SALUMETS, A. Bovine sperm plasma membrane proteomics through biotinylation and subcellular enrichment. **Proteomics**, v.15, n.11, p.1906-1920, 2015.

KEFER, J.; AGARWAL, A.; SABANEKH, E. Role of antioxidants on the treatment of male infertility. **International Journal of Urology**, v.16, n.5, p.449-457, 2009.

KEHRER, J. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v.149, p.43-50, 2000.

KELLER, A.; NESVIZHSHKII, A.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v.74, n.20, p.5383-5392, 2002.

KHALILI, M.; ZARE, N.; HASHEMI, H. Correlation between sérum lipids profile with sperm parameters of infertile men with abnormal semen analysis. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.7, n.3, p.123-127, 2009.

KHATUN, A.; RAHMAN, M.; PANG, M. Clinical assessment of the male fertility. **Obstetrics and Gynecology Science**, v.61, n.2, p.179-191, 2018.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B.; PEKNICOVÁ, J.; JONAKOVÁ V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproduction Immunology**, v.65, n.1, p.33-46, 2005.

KUMAR, P.; KUMAR, D.; SINGH, I.; YADAV, P. Seminal plasma proteome: promising biomarkers for bull fertility. **Agricultural Research**, v.1, n.1, p.78-86, 2012.

LAEMMLI, K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p. 680, 1970.

LEDESMA, A.; MANES, J.; CESARI, A.; ALBEIRO, R.; HOZBOR, F. Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in corriedale rams. **Reproduction in Domestic Animal**, v.49, n.2, p.324-332, 2014.

LEDESMA, A.; FERNÁNDEZ, E.; CANO, A.; HOZBOR, F.; MARTÍNEZ, F.; CESARI, A. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. **Animal Reproduction Science**, v.173, p.35-41, 2016

LETÉLIER, M.; SANCHEZ, S.; PEREDO, L.; CORTES, J.; ARACENA. P. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: pro-oxidant activity and protein-binding effects. **Chemico-Biological Interactions**, v.188, n.1, p.220-227, 2010.

LI, S.; HWU, Y.; LU, C.; LIN, M.; YEH, L.; LEE, R. Serine protease inhibitor serpine2 reversibly modulates murine sperm capacitation. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v.19, v.5, p.1520, 2018.

LIMA, F.; XAVIER, P.; GERGMANN, J.; MARQUES, A. Perímetro escrotal e características seminais de Touros da raça Nelores selecionadas para precocidade sexual. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1603-1608, 2013.

LOPES, M.; BRANCO, V.; SOARES, J. Utilização dos testes estatísticos de kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificação da normalidade para materiais de pavimentação. **Transporte**, v.21, n.1, p.59-66, 2013.

LU, C.; LEE, R.; HWU, Y.; CHU, S.; CHEN, Y.; CHANG, W.; LIN, S.; LI, S. Serpine2, a serine protease inhibitor extensively expressed in adult male mouse reproductive tissues, may serve as a murine sperm decapacitation factor. **Biology of Reproduction**, v.84, n.3, p.514-525, 2011.

LIU, C.; CHOU, Y.; CHAO, J.; HSU, C.; CHA, T.; TSAO, C. The association between dietary patterns and semen quality in a general asian population of 7282 males. **Plos One**, v.10, n.7, p.e0134224, 2015.

LUI, C.; CHOU, Y.; LIN, S.; WU, S.; CHA, T.; CHEN, H.; TSAO, C. Serum lipid profiles are associated with semen quality. **Asian Journal of Andrology**, v.19, n.6, p.633-638, 2017.

LUSIGNAN, M.; MANJUNATH, P.; LAFLEUR, M. Thermodynamics of the interaction between bovine binder of sperm BSP1 and low-density lipoprotein from hen's egg yolk. **Thermochimica acta**, v.516, n.1, p.88-90, 2011.

MACANOVIC, B.; VUCETIC, M.; JANKOVIC, A.; STANCIC, A.; BUZADZIC, B.; GARALEJIC, E.; KORAC, A.; KORAC, B.; OTASEVIC, V. Correlation between sperm parameters and proteins expression of antioxidative defense enzymes in seminal plasma: a pilot study. **Disease Markers**, v.2015, p.5, 2015.

MACHAL, L.; CHLÁDEK, G.; STRAKOVÁ, E. Copper, phosphorus and calcium in bovine blood and seminal plasma in relation to semen quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.11, p.425-435, 2002.

MACIEL, J.; SILVA, E.; NASCIMENTO, P.; GUIDO, S.; SANTOS, A.; BARTOLOMEU, C. Avaliação de parâmetros andrológicos de touros das raças Holandesa e Guzerá submetidos ao semiarido. **Scientia Plena**, v.11, n.4, p.046120, 2015.

MAGALHÃES, M.; MARTINS, L.; LIMA, R.; FERREIRA, T.; OKANO, D.; PEREIRA, P.; FARIAS-CAMPOS, A.; CAMPOS, S.; GUIMARÃES, J.; BARACAT-PEREIRA, M. Differential abundances of four forms of Binder of SPerm 1 in the seminal plasma of *Bos taurus indicus* bulls with diferente patterns of sêmen freezability. **Theriogenology**, v.86, n.3, p.766-777, 2016.

MALIK, M.; JAMIL, H.; QURESHI, Z.; MEHFOOZ, A.; RIZVI, S.; ULLAH, S.; DILSHAD, S.; ZAMAN, A.; ULLAH, N.; SAFDAR, S.; JELANI, G.; MARIS, H.; MAJID, A.; KHAN, M. Investigation on relationship of hormonal profile and biochemical constituents of seminal plasma with physical characteristics of damani buck. **Pure and Applied Biology**, v.7, n.2, p.6840-691, 2018.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding protein in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, n.1, p. 109-119, 2002.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v.65, p.217, 2007.

MANJUNATH, P.; New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biology of Reproduction**, v.80, n.3, p.394-397, 2009.

MANNOWETZ, N.; WANDERNOTH, P.; WENNENUTH, G. Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation. **Plos One**, v.7, n.7, p.e41030, 2012.

MENEZES, E.; DE OLIVEIRA, R.; VAN TILBURG, M.; BARBOSA, E.; NASCIMENTO, N.; VELHO, A.; MORENO, F.; MOREIRA, R.; MONTEIRO, A.; CARVALHO, G.; RAMOS, A.; MEMILI, E.; MOURA, A. Proteomic analysis of seminal plasma from locally-adapted

“curraleiro pé-duro bull” (*Bos taurus*): identifying biomarkers involved in sperm physiology in endangered animals for conservation of biodiversity. **Animal Reproduction Science**, v.183, p.86-101, 2017.

MERLE, N.; IGREJA, S.; FREMEAUX, V.; ROUMENINA, L. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. **Front in Immunology**, v.6, n.262, p.00262, 2015.

MI, H.; POUDEL, S.; MURUGANUJAN, A.; CASAGRANDE, J.; THOMAS, P. PANTHER versão 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.44, p.336-342, 2016.

MOHAMMAD, M.; MANINGAT, P.; SUNEHAG, A.; HAYMOND, M. Precursors of hexoneogenesis within the human mammary gland. **American Journal of Physiology-Endocrinology**, v.308, n.8, p.680-688, 2015.

MOURA, A.; CHAPMAN, D.; KOC, H.; KILLIAN, G. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, v.27, n.4, p.534-541, 2006.

MOURA, A.; SOUZA, C.; STANLEY, B.; CHAPMAN, D.; KILLIAN, G. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein Bulls. **Journal of Proteomics**, v.73, n.10, p.2006-2020, 2010.

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

MUKAI, C.; TRAVIS, J. What sperm can teach us about energy production. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.164-169, 2012

NASCIMENTO, D.; TIBANA, R.; MELO, G.; PRESTES, J. Teste de normalidade em análises estatísticas: uma orientação para praticantes em ciências da saúde e atividade física. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v.14, n.2, p.73-77, 2015.

NESVIZHSHKII, A.; KELLER, A.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.75, n.17, p.4646-4658, 2003.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of complement activation and regulation. **Seminars in Nephrology**, v.33, n.6, p.479-492, 2013.

NOVAK, S.; SMITH, T.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M.; FOXCROFT, G.; DIXON, W. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**, v.74, n.6, p.956-967, 2010.

NOWICKA-BAUER, K.; PEPCZYNSKI, A.; OZGO, M.; KAMIENICZNA, M.; FRACZEK, M.; STANSKI, L.; OLSZEWSKA, M.; MALCHER, A.; SKRZYPCZAK, W.; KURPISZ, M. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.63, n.3, p.403-417, 2018.

OLIVERA, M.; RUIZ, T.; TARAZONA, A.; GIRALDO, C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.19, n.4, p.426-436, 2006.

OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, C.; MONTEIRO, F.; MARTINS, V.; DE LIMA, H.; MARTIS, F.; COSTA, M. Efeito da idade sobre as principais características andrológicas de touros Brangus-ibagé criados extensivamente no estado do Mato Grosso do Sul – Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.1, p.946, 2011.

PALANI, A. Effect of serum antioxidant levels on sperm function on infertile male. **Middle East Fertility Society Journal**, v.23, n.1, p.19-22, 2018.

PARAB, S.; SHETTY, O.; GAONKAR, R.; BALASINOR, N.; KHOLE, V.; PARTE, P. HDAC6 deacetylates alpha tubulin in sperm and modulates sperm motility in holtzman rat. **Cell and Tissue Research**, v.359, n.2, p.665-678, 2015.

PARISI, A.; THOMPSON, S.; KAYA, A.; MEMILI, E. Molecular, cellular, and physiological determinants of bull fertility. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v.38, n.6, p.637-642, 2014.

PATRICIO, A.; CRUZ, D.; SILVA, J.; PADRÃO, A.; CORREIA, B.; GREGÓRIO, L.; FERREIRA, R.; MAIA, N.; ALMEIDA, A.; LOURENÇO, J.; SILVA, V.; FARDILHA, M. Relation between seminal quality and oxidative balance in sperm cells. **Acta Urológica Portuguesa**, v.33, n.1, p.6-15, 2016.

PENITENTE-FILHO, J.; CASTAÑO, F.; FONSECA, F.; SOARES, B.; GOMEZ, V.; PEIXOTO, T.; DIAZ, E.; OKANO, D.; MAITAN, P.; LIMA, D.; GUIMARÃES, S.; SIQUEIRA, J.; PINHO, R.; GUIMARÃES, J. Can scrotal circumference-based selection discard bulls with good productive and reproductive potencial? **Plos One**, v.13, n.3, p.e193103, 2018.

PINI T, FARMER K, DRUART X, TEIXEIRA-GOMES AP, TSIKIS G, LABAS V, LEAHY T, GRAAF S. Binder of sperm proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. **Cryobiology**, v.82. p.78-87, 2018.

PLANTE, G.; MANJUNATH, P. Epididymal binder of sperm genes and proteins: what do we know a decade later? **Andrology**, v.3, n.5, p.817-824, 2015.

PLANE, G.; PRUD'HOMME, B.; FAN, J.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. **Cell and Tissue Research**, v.363, n.1, p.105-127, 2016.

PLESSIS, S.; AGARWAL, A.; MOHANTY, G.; VAN DER LINDE, M.; Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? **Asian Journal of Andrology**, v.17, n.2, p.230-235, 2015.

RÊGO, J.; CRISP, J.; MOURA, A.; NOUWENS, A.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N.; CORBET, D.; BURNS, B.; BOE-HANSE, G.; McGOWAN, M. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bull. **Animal Reproduction Science**, v.148, n.1, p.1-17, 2014.

RÊGO, J.; MOURA, A.; NOUWENS, A.; MCGOWAN, M.; BOE-HANSEN, G. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in brahman bulls. **Animal Reproduction Science**, v.160, p.126-137, 2015,

RÊGO, J.; MARTINS, J.; WOLF, C.; VAN TIBURG, M.; MORENO, F.; MONTEIRO, C.; MOREIRA, R.; SANTOS, D.; MOURA, A. Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in guzerat bulls. **Journal Animal Science**, v.94, n.12, p.5308-5320, 2016.

RESJO, S.; BRUS, M.; ALI, A.; MEIJER, H.; SANDIN, M.; GOVERS, F.; LEVANDER, F.; GRENVILLE-BRIGGS, L.; ANDREASSON, E. Proteomic analysis of *Phytophthora infestans* reveals the importance of cell wall proteins in pathogenicity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.16, n.11, p.1958-1971, 2017.

ROBERTSON, S.; SHARKEY, D. Seminal fluid and fertility in women. **Fertility and Sterility**, v.106, n.3, p.511-519, 2016.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.; ESPER, C.; BARNABE, V.; FRANCESCHINI, P. Fertility-associated proteins in nelore bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, v.91, n.1, p.77-87, 2006.

RODRÍGUEZ, G.; BARRIOS, M.; HUANCA, L.; RODRIGUEZ, G.; REVUELTA, L. Niveles de glucosa y triglicéridos en plasma seminal y motilidad espermática en cobayos alimentadas con 10% más en energía digestible. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v.10, n.1, p.75-82, 2016.

RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; HOYOS, V.; MARTINS, J.; OLIVEIRA, A.; AGUIAR, L.; MORENO, F.; VELHO, A.; MONTEIRO, A.; MOREIRA, R.; VASCONCELOS, I.; BERTOLINI, M.; MOURA, A. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP 1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v.85, n.3, p.540-554, 2016.

ROYCHOUDHURY, S.; SHARMA, R.; SIKKA, S.; AGARWAL, A. Diagnostic application of total antioxidant capacity in seminal plasma to assess oxidative stress in male factor infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. V.33, n.5, p.627-635, 2016.

ROZMAN, D.; HORVAT, S. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. **Journal of Lipid Research**, v.54, n.1, p.20-33, 2013.

SAADI, H.; VAN RIEMSDIJK, E.; DANCE, A.; RAJAMANICKAM, G.; KASTELIC, J.; THUNDATHIL, J. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. **Journal of Proteomic**, v.82, p.64-80, 2013.

SAEG – **Sistema para Análises Estadísticas. Versão 9.1**: Fundação Arthur Bernardes. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

SAEWU, A.; ASUVAPONGPATANA, S.; CHATWIWATTHANAKUN, C.; TANTIWONGSE, A.; WEERACHATYANUKUL, W.; THITILERTDECHA, S. Cathepsin D in human reproductive tissues: cellular localization in testis and epididymis and surface distribution in different sperm conditions. **Journal of Andrology**, v.33, n.4, 726-764, 2012.

SALEHI, M.; AKBARI, H.; HEIDARI, M.; MOLOUKI, A.; MURULITHARAN, K.; MOEINI, H.; NOVIN, M.; AABED, F.; TAHERI, H.; FADAEI F.; MOHSENZADEH, M.; JAFARI, M.; PIROUZI, A.; HEIDARI, R. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. **Molecular Reproduction and Development**, v.80, p.718-724, 2013.

SANKHALA, R., SWAMY, M. The major protein of bovine seminal plasma, PDC-109, is a molecular chaperone. **Biochemistry**, v.49, n.18, p.3908-2918, 2010.

SAMANTA, L.; PARIDA, R.; DIAS, T.; AGARWAL, A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.16, n.1, p.41, 2018.

SARASWAT, M.; JOENVÄÄRÄ, S.; JAIN, T.; KUMAR, A.; SINHA, A.; SINGH, S.; YADAV, S.; RENKONEN, R. Human spermatozoa quantitative proteomic signature classifies normo-and asthenozoospermia. **Molecular and Cellular Proteomics**, v.16, n.1, p.57-72, 2017.

SCHISTERMAN, E.; MUMFORD, S.; CHEN, Z.; BROWNE, R.; BOYD, D.; KIM, S.; BUCK, G. Lipid concentrations and semen quality: the LIFE study. **Andrology**, v.2, n.3, p.408-415, 2014.

SCHJENKEN, J.; GLYNN, D.; SHARJEY, D.; ROBERTSON, S. TLR4 signaling is a major mediator of the female tract response to seminal fluid in mice. **Biology of Reproduction**, v.93, n.3, p.68-1-13, 2015.

SCHRÖTER, F.; MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; KRAUSE, M.; BRAUN, B. Recombinant expression of porcine spermadhesin AWN and its phospholipid interaction: indication for a novel lipid binding property. **Reproduction in Domestic animals**, v.52, n.4, p.585-595, 2017.

SERRANO, E.; PEREZ, R.; CALLEJA, L.; GUILLEN, N.; CASAO, A.; HURTADO, R.; MUINO, T.; CEBRAIN, J.; Characterization of the c-DNA and in vitro expression of the ram seminal plasma protein RSVP14. **Gene**, v.519, v.2, p.271-278, 2013.

SHEN, S.; WANG, J.; LIANG, J.; HE, D. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. **World Journal of Urology**, v.31, n.6, p.1395-1401, 2013.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, n.1, v.6, p.2856-2860, 2006.

SHIVA, M.; GAUTAM, A.; VERMA, Y.; SHIVGOTRA, V.; DOSHI, H.; KUMAR, S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidante activity. **Clinical biochemistry**, v.44, n.4, p.319-324, 2011.

SIOW, Y.; STOKE, S.; COOK, C.; TAYLOR, S.; GOLDSMITH, L.; BELKER, A.; YOFFE, C.; FALLAT, M. Effects of vasoactive intestinal peptide on human sperm motility. **Archives of Andrology**, v.43, p.67-71, 1999.

SIQUEIRA, J.; OBA, E.; PINHO, R.; GUIMARÃES, S.; NETO, T.; GUIMARÃES, J. Heritability estimate and genetic correlations of reproductive features in Nelore bulls, offspring of super precocious, precocious and normal cows under extensive farming conditions. **Reproduction in Domestic Animal**, v.47, n.2, p.313-318, 2012.

SIQUEIRA, J.; GUIMARÃES, J.; PINHO, R. Relação entre perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas em bovinos de corte: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.1, p.3-13, 2013.

SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; KOHNKE, DACHEUX, J.; GUÉRIN, Y.; GATTI, J.; DE GRAAF, S.; DRUART, X. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v.109, p.245-260, 2014.

SOMASHEKAR, L.; SELVARAJU, S.; PARTHIPAN, S.; PATIL, S.; BINSILA, M.; VENKATASWAMY, M.; KARTHIK, S.; RAVINDRA, J. Comparative sperm protein profiling in bulls differing in fertility and identification of phosphatidylethanolamine-binding protein 4, a potencial fertility marker. **Andrology**, v.5, n.5, p.1032-1051, 2017.

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

SRIVASTAVA, N.; JEROME, A.; SRIVASTAVA, S.; GHOSH, S.; KUMAR, A. Bovine seminal PDC-109: An overview of biochemical and functional propeties. **Animal Reprodction Science**, v.138, n.1, p.1-13, 2013.

STROMOVÁ, X.; HAMPL, R.; STEPÁN, J.; KANDÁR, R. Role of fatty acids in sperm membrane. **Ceská Gynekologie**, v.79, n.2, p.103-106, 2014.

SUAREZ, S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. **Cell and Tissue Research**, v.363, v.1, p.185-194, 2016.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; KUHN, M.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; MINQUEZ, P.; DOERKS, T.; STARK, M.; BORK, P.; JENSEN, L.; VON MERING, C. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. **Nucleic Acids Research**, v.39, D561-8, 2011.

TÖPFER, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.; EKHLASI, M.; DOSTÁLOVA, Z.; CALVETE, J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrology**, v.30, n.4, p. 217-224, 1998.

TVRDÁ, E.; KNAZICKÁ, Z.; LUKÁCOVÁ, J.; SCHNEIDGENOVÁ, M.; MASSÁNYI, P.; GOC, Z.; STAWARZ, R.; LUKÁČ, N. Relationships between iron and copper content, motility characteristics and antioxidative status in bovine seminal. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. v.2, n.2, p.536-547, 2012.

TVRDÁ, E.; LUKÁČ, N.; SCHNEIDGENOVÁ, M.; LUKÁCOVÁ, J.; SZABÓ, C.; GOC, Z.; GREN, A.; MASSÁNYI, P. Impact of seminal chemical elements on the oxidative balance in bovine seminal plasma and spermatozoa. **Journal of Veterinary Medicine**, v.2013, p.125096, 2013.

TVRDÁ, E.; PEER, R.; SIKKA, S.; AGARWAL, A. Iron and copper in male reproduction: a double-edged sword. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.32, n.1, p. 3-16, 2015.

VALIENTE, S.; PRISCO, M.; SCIARRILLO, R.; DE FALCO, M.; CAPALDO, A.; GAY, F.; ANDREUCCETTI, P.; LAFORGIA, V.; VARANO, L. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptors: distribution and involvement

in the secretion of podarcis sicula adrenal gland. **Journal of Endocrinology**, v.196, n.2, p.291-303, 2008.

VALSA, J.; SKANDHAN, K.; GUSANI, P.; SAHAB, P.; AMITH, S. Quality of 4-hourly ejaculates levels of calcium and magneseium. **Andrologia**, v.45, n.1, p.10-17, 2013.

VANCONCELOS, C.; GUIMARÃES, J.D.; GUIMARÃES, S.F.; COSTA, E.; MIRANDA NETO, T.; DIAS, F. Estádio de maturidade sexual em touros da raça Nelore dos 20 a 22 meses de idade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.174-176, 2003.

VELHO, A.; MENEZES, E.; DINH, T.; ADBULLAH, K.; TOPPER, E.; MOURA, A.; MEMILI. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. **Plos One**, v.13, n.4, p. e0195279, 2018.

VIANA, A.; MARTINS, A.; PONTES, A.; FONTES, W.; CASTRO, M.; RICART, C, SOUSA, V.; TOPPER, E.; MEMILI, E.; MOURA, A. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p.16323, 2018.

WAGNER, H.; CHENG, J.; KO, E. Role of reactive oxygen species in male infertility: Na updated review of literature. **Arab Journal of Urology**, v.16, n.1, p.35-43, 2018.

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolismo. **Biochemical Journal**, v.434, n.3, p.365-381, 2011.

WANG, H.; YU, F.; ZHANG, Z.; HOU, Y.; TENG, W.; SHAN, Z.; LAI, Y. Effects of circulating member B of the Family with sequence similarity 3 on the risk of developing metabolic syndrome and its componentes: A 5-year prospective study. **Journal Diabetes Investigation**, v.9, n.4, p.782-788, 2018.

WESTFALEWICSZ, B.; DIETRICH, M.; MOSTEK, A.; PARTYKA, A.; BIELAS, W.; NIZANSKI, W.; CIERESZKO A. Analysis o bull (bos taurus) seminal vesicle fluid proteome in relation to seminal plasma proteome. **Journal Dairy Science**, v.100, n.3, p.2282-2298, 2017.

WHITFIELD, M.; POLLET, X.; LEVY, R.; DREVET, J.; SAEZ, F. Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia. **Asian Journal of Andrology**, v.17, n.5, p.742-748, 2015.

WILSON, C.; SCHUPP, M.; BURKHARDT, B.; WU, J.; YOUNG, R.; WOLF, B. Liver-specific overexpression of pancreatic-derived factor (pander) induces fasting hyperglycemia in mice. **Endocrinology**, v.151, n.11, p.5174-5184, 2010.

WONG, W.; FLIK, G.; GROENEN, P.; SWINKELS, D.; THOMAS, C.; COPIUS, J.; MERKUS, H.; STEEGERS. The impact of calcium, magnesium, zinc and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive Toxicology**, v.15, n.2, p.131-136, 2001.

WU, J.; YANG, H.; WANG, S.; SONI, K.; BRUNEL, C.; MITCHELL, G. Inborn errors of cytoplasmic triglyceride metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.38, n.1, p.85-98, 2015.

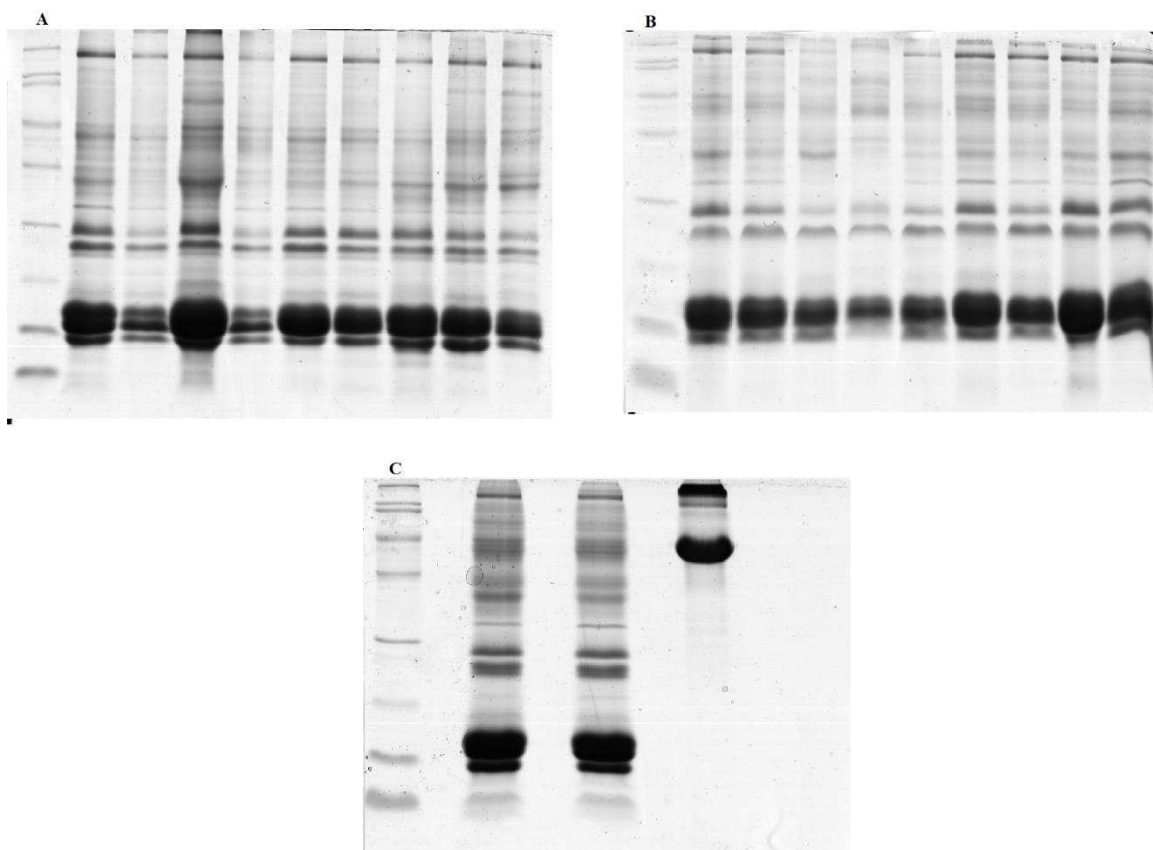
YAN, M.; ZHANG, X.; PU, Q.; HUANG, T.; XIE, Q.; WANG, Y.; LI, J.; WANG, Y.; GU, H.; HUANG, T.; LI, Z.; GU, J. Immunoglobulin G expression in human sperm and possible functional significance. **Scientific Reports**, v.6, p.20166, 2016.

ZALATA, A.; EL-SAMANOUDY, A.; SHAALAN, D.; EL-BAOIMY, Y.; TAYMOUR, M.; MOSTAFA, T. Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men. **Journal of Urology**, v.188, n.4, p.1260-1264, 2012.

ZHANG, X.; YANG, W.; WANG, J.; MENG, Y.; GUAN, Y.; YANG, J. FAM3 gene family: a promising therapeutic target for NAFLD and type 2 diabetes. **Metabolism**, v.81, p.71-82, 2018.

ZHOU, J.; CHEN, L.; LI, J.; LI, H.; HONG, Z.; XIE, M.; CHEN, S.; YAO, B. The semen pH affects sperm motility and capacitation. **Plos One**, v.10, n.7, p. e0132974, 2015.

ANEXO 1 Eletroforese monodimensional do plasma seminal de Touros da raça Nelore classificados como aptos e inaptos à reprodução.



ANEXO 2 Caracterização das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore, entre 19,8 a 22,7 meses de idade, classificados como aptos e inaptos à reprodução, identificadas por LC-MS/MS

ID Proteína	Nome Proteína	MW	pI	Prob. id. Proteína	Secuencia de Peptídeos	Pro. id. de Peptídeos	Cobertura
Q8HZY1	Serine protease inhibitor clade E member 2	43.8 KDa	9,56	100%	AKIEVSEDGTK	100%	57%
					ASAATTAILIAR	100%	
					DIVMVANAVFVK	100%	
					DVFQCEVR	100%	
					FLLPVPQLK	100%	
					FLPENTK	100%	
					FTAVAQTDLKEPLK	100%	
					HNPTGAVLFMGQINKP	100%	
					IEVSEDGTK	100%	
					KQLTTVMR	100%	
					LASVAAGAFR	100%	
					LQVLGEGLLAPQPK	100%	
					LVLVNAVYFK	100%	
					MEVPFVTR	100%	
					NANFEDPASACASINAWVR	100%	
					NKDIVMVANAVFVK	100%	
					QLTTVMR	100%	
					RVQVILPK	100%	
					SENLHVSHILQK	100%	
					SQPHDNIIISPHGIASVLGMLQLGADGR	100%	
					SSPPWFIVDRPFLFFIR	100%	
					SYQVPMLAQLSVFR	100%	
					TIDSWVSTMVPK	100%	
					VLGITDMFDPSK	100%	

					VQVILPK	100%	
					EESGVIATYYGPK	100%	
					EPEHPASFYEVLYFQDPQA	100%	
					ESLEIIDGLPGSPVLGK	100%	
					ICEGSLMDYR	100%	
					NTNcGGILK	100%	
P29392	Spermadhesin-1	15.0 KDa	5.06	100%	NTNCGGILKEESGVIATYYGPK	100%	81%
					SSGSIMTVKYIR	100%	
					TNCVWTIQMPPEYHVR	100%	
					VSIQYLQLNCNK	100%	
					YIREPEHPASFYEVLYFQDPQA	100%	
					ASSIMDELFQDRFFLR	100%	
					CQEILEVDCSASNPTQTLLR	100%	
					ELQEMSTEGSK	100%	
					EQSHVMDVMEDSFTR	100%	
					GSLFFNPK	100%	
					IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR	100%	
P17697	Clusterin	51.1 KDa	5.73	100%	KLLSSLEEAK	100%	43%
					LFNSFPITVTPQEVSSPNFMENVAEK	100%	
					LYDQLLQSYQQK	100%	
					QQLNASLQLAEK	100%	
					RPQDTQYYSPFSSFPR	100%	
					TPYHFPTMEFTENNDR	100%	
					TQIEQTNEER	100%	
					AAVYNHFISDGVKK	100%	
Q2UVX4	Complement C3	187.2 KDa	6.41	100%	ADIGCTPGSGR	100%	37%
					AFLDCCEYITQLR	100%	

AILYNYR	100%
AYYEDSPQQVFSAEFEVK	100%
DGALELAR	100%
DPLTITVR	100%
DSCMGTLVVK	100%
DSITTWEILAVSLSDKK	100%
EEVPAADLSQVPDTESETK	100%
EKDVS LTAFVLIALHEAK	100%
EVTLEDRLDK	100%
EVVADSVWVDVK	100%
EYVLPSFEVQLEPEEK	100%
FFKPAMPFDLMVYVTNPDGSPAR	100%
FYHPDKEDGMLSK	100%
FYYIDDPDGLK	100%
GQGTLSVVTYHAK	100%
GSMILDICTK	100%
GVFVLNKK	100%
GYTQQLAFR	100%
HQQTITIPAR	100%
IGLHEVEVK	100%
ILLQGTPVAQMTEDAIDGER	100%
ILWESASLLR	100%
ISLTHSLTR	100%
KDYDTTPPVVR	100%
KGYTQQLAFR	100%
KIWDVVEK	100%
LLPVGQTVFITIETPDGIPVK	100%
LMNVFLK	100%

LPYSVVR	100%
NYAGVFTDAGLTLK	100%
QVLLNGVQPSR	100%
RDPLTITVR	100%
RPYTVAIAAYALALLGK	100%
RQESLELIR	100%
SDLDDDIPEEDIISR	100%
SQFPESWLWTVIEDLK	100%
SSVAVPYVIVPLK	100%
TGIPIVTSPYQIHFTK	100%
TIYTPGSTVLRY	100%
TLNPEHLGQGGVQR	100%
TMQALPYNTQGNSNNYLHLSVPR	100%
VELKPGETLNVNFHLR	100%
VFALAANLIAIDSK	100%
VGLVAVDK	100%
VHQYFNVGLIQPGAVK	100%
VPINDGNGEAILK	100%
VSHTVEDCLSFK	100%
VSIRPAPETVK	100%
VYSYYNLDETCIR	100%
WLILEK	100%
YYTYMIMNK	100%

A0A0E3UT00	Tissue inhibitor of metalloproteinase-2	21.7 KDa	7.01	100%	CPMIPCYISSPDECLWMDWVTEK	100%	49%
------------	---	----------	------	------	-------------------------	------	-----

A6QQA8	Sulphydryl oxidase	62.9 KDa	9.26	100%	EVDSGNDIYGNIPIK	100%	52%
					EYLIAGK	100%	
					GAAPPKQEFLDIEDP	100%	
					IQYEIKQIK	100%	
					KEVDSGNDIYGNIPIK	100%	
					KEYLIAGK	100%	
					RIQYEIK	100%	
					RSDGSCAWYR	100%	
					SDGSCAWYR	100%	
					YQMGCECK	100%	
					AQEVQLAIR	100%	
					DFNIPGFPTVR	100%	
					ECAGHFEQMASGSMHR	100%	
					ELCSACHNELR	100%	
					EVTLDLSQHQGIAVR	100%	
					FFFGCR	97%	
					FGVTNFPSCYLLSR	100%	
					FMAVLAK	100%	
					FSVLEGQR	100%	
					GRPLVQNFLHSMNDWLK	100%	
GTPVWDLNLIK	100%						
IPYGFFK	100%						
IYMADLESALHYILR	100%						
KFMAVLAK	100%						
KIPYGFFK	100%						
LAGAPSEDPQFPK	100%						
LEEITGFFAR	100%						
LIDALESHSDTWPPACPPLEPAR	97%						

					NNEEYLALIFEK	100%	
					SALYSSTDPLTLR	100%	
					SFYTTYLR	100%	
					TGSGTTLVAGADVQTLR	100%	
					THFSPSNIVLDFPSAGPGPWR	100%	
					VGSLNSAVLWFWSSHNK	100%	
					VNWVGCQGSEPHFR	100%	
					VPALTESR	100%	
					ASLAFLQKHLGLQK	100%	
					CGIALDAWMFPVGDEVYSR	100%	
					DGSASSTYYFK	100%	
					EYFLGLSK	100%	
					FLGTHWLVGK	100%	
					FQYPSNIIR	100%	
					GDIDSNVAISLSNK	100%	
					GEEEFPLRNEQLR	98%	
Q28017	Platelet-activating factor acetylhydrolase	50.1 KDa	6.12	100%	GSVHQNFVDFTFATSK	100%	49%
					IAIIGHSFGGATVIQTLSEDQR	100%	
					IIGYLFTLK	100%	
					IMGLFFGSMTTPAAWNAHLR	100%	
					IPQPLFFINER	100%	
					IQALMAAANIGQSK	100%	
					KMITIR	99%	
					RGEEEFPLR	100%	
					TGEKYPLIIFSHGLGAFR	100%	
					YPLIIFSHGLGAFR	100%	
Q28085	Complement factor H	140.3 KDa	6.43	100%	CAAGFEYGQR	100%	25%

					CLSYYQLDGSNTIQCIK	100%	
					CQAYYELR	100%	
					EAFTMIGPR	100%	
					ECSIPEMDPYLNAYPR	100%	
					EIHKEEYAHNEVVEYACNPR	98%	
					ENYLIQDAEEIVCK	100%	
					GFFPEIR	98%	
					GSTLFPPEGR	100%	
					IENGFLSESTFTYPLNK	100%	
					IMVGADSVQCYHFGWSPK	98%	
					ISILCK	100%	
					KGFFPEIR	100%	
					LDYECVDGYENR	100%	
					LNDRLDYECVDGYENR	100%	
					LYYSYR	100%	
					NGEWSQLPK	100%	
					QIHCSAGGVWSAETPK	100%	
					SCDRPVFEK	100%	
					SDGTWFR	100%	
					SGWTPAPTCIEITCDPPR	100%	
					TPVILNGQAVLPK	100%	
					TSLITCLK	100%	
					TTGSIVCGQDGWSDK	100%	
					VVYTCDEGYQMVGEMNFR	99%	
					WVSLHPSR	100%	
					YLQGETVR	100%	
P02769	Serum albumin	69.3 KDa	5.82	100%	AEFVEVTK	100%	46%
					DAFLGSFLYEYSR	100%	

					DDPHACYSTVFDK	100%	
					EACFAVEGPK	100%	
					EYEATLEECCA	100%	
					FKDLGEEHFK	100%	
					HLVDEPQNLIK	100%	
					HPEYAVSVLLR	100%	
					HPYFYAPELLYYANK	100%	
					KQTALVELLK	100%	
					KVPQVSTPTLVEVSR	100%	
					LCVLHEK	100%	
					LFTFHADICTLPDTEK	100%	
					LGEYGFQNALIVR	100%	
					LKECCDKPLLEK	99%	
					LVNELTEFAK	100%	
					MPCTEDYLSLILNR	100%	
					NECFLSHKDDSPDLPK	100%	
					QTALVELLK	100%	
					RHPEYAVSVLLR	100%	
					RPCFSALTPDETYVPK	99%	
					SLHTLFGDELCK	100%	
					TVMENFVAFVDK	100%	
					VPQVSTPTLVEVSR	100%	
					YICDNQDTISSK	100%	
					AKWETSFNLK	100%	
					AQILEGLGIGPEGSEELHSASQR	100%	
Q9N2I2	Plasma serine protease inhibitor	45.2 KDa	9.40	100%	DFVFDLYR	100%	49%
					DIFTSDADLTGISNHSSIR	100%	
					EGEMEQQVENGLK	100%	

Q0P569	Nucleobindin-1	54.9 KDa	5.11	100%	ELQQPQDSLQLSLGNALFTKPR	100%	41%
					FSIEGSYQLEEVLPK	100%	
					HILFLGK	100%	
					IVDLIK	100%	
					LELYLPK	100%	
					LPIQEAFLGAMR	100%	
					QQDQFYLLDR	100%	
					RLELYLPK	100%	
					SLDGTQVMVMVNYIFFK	100%	
					STHEQDFYVTPETVVR	100%	
					TLYLADTFPTNFEDPEGAK	100%	
					WETSFNLK	100%	
					DLAQYDAAHHEEFKR	100%	
					DLELLIQTATR	100%	
					ELDFVSHHVR	100%	
					ELQQAVLQMEQR	100%	
					EVWEELDGLDPNR	100%	
					FEEELAAR	99%	
					LQAANAEDIK	100%	
					LSQETEALGR	100%	
					LVTLEEFLASTQR	100%	
					MDAQQEPNIQLDHLNLLK	98%	
					NEDDDMREMEER	99%	
					QFEHLDPQNQHTFEAR	100%	
					RFEEELAAR	100%	
					TFFILHDINSDGVLDEQELEALFTK	100%	
					VNVPQSQAQLK	100%	
					YLESLGEEQRK	100%	

G1CW25	Lactoferrin	78.1 KDa	8.70	100%	YLQEVINVLETDGHFR	100%	39%
					AFALECIR	97%	
					ANEGLTWNSLK	100%	
					CLQDGAGDVAFVK	100%	
					DSALGFLR	100%	
					ETTVFENLPEK	100%	
					FFSASCVPCIDR	100%	
					GEADALNLDGGYIYTAGK	100%	
					GSNFQLDQLQGR	100%	
					KGSNFQLDQLQGR	100%	
					LCALCAGDDQGLDK	100%	
					LGAPSITCVR	100%	
					LRPVAAEIYGTK	100%	
					NLLFNDNTECLAK	100%	
					SFQLFGSPPGQR	100%	
					VDSALYLGSR	100%	
					WCTISQPEWFK	100%	
					YYGYNGAFR	100%	
P80311	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	23.7 KDa	9.33	100%	DFMIQGGDFTR	100%	58%
					DKPLKDVTIADCGK	100%	
					DTNGSQFFITTVK	100%	
					FPDENFK	100%	
					HYGPGWVSMANAGK	100%	
					IEVEKPFAIAKE	100%	
					IGDEDIGR	100%	
					TAWLDGK	99%	
					TVDNFVALATGEK	100%	
					VIKDFMIQGGDFTR	100%	

Q4R0H2	Spermadhesin 2	15.2 KDa	5.92	100%	VLEGMDVVR	100%	46%
					VVIGLFGK	100%	
					VYFDLR	100%	
					ESLEIIEGPPESSNSR	100%	
					ICDTSHAEYTSCTNTMTVK	100%	
					ILLEVR	100%	
					KICDTSHAEYTSCTNTMTVK	100%	
					KPNHPAPDFFLIFR	100%	
					MDPGYR	99%	
					AGESVLLYTKPVPELLK	100%	
Q29444	Beta-mannosidase	101.1 KDa	6.52	100%	AVNIIEVR	99%	23%
					FNNLDYR	100%	
					FQSPVVYANQR	100%	
					FSDNGFLMTEK	100%	
					GSNWIPADSFQDR	99%	
					IESSFDVVSSK	100%	
					INGLPIFLK	100%	
					LLLQSVVDANMNALR	100%	
					MLHYFAR	98%	
					SELEQSFHVTSLADTY	100%	
					SSFALHR	99%	
					TSAVAPFVWLDVGSIPGR	100%	
					TVELFVK	99%	
					TVFFYPWKPTSK	100%	
					VSSEEDWSYR	100%	
					VVSISLR	100%	
					WIALDNWTYIK	98%	
					YSFDITHTVK	100%	

P81019	Seminal plasma protein BSP-30 kDa	21.2 KDa	5.73	100%	ANDLNAVFE GPACAFPF TYK	100%	45%
					DEPECVFPFIYR	100%	
					FCTERDEPECVFPFIYR	100%	
					KNSVLLWCSLDTEYQGNWK	100%	
					KYYMCTR	97%	
					NSVLLWCSLDTEYQGNWK	100%	
					RWCSLTSNYDR	100%	
					VHSFFWR	98%	
					WCSLTSNYDRDK	100%	
					YYMCTR	98%	
P04557	Seminal plasma protein A3	16.1 KDa	4.90	100%	CVFPFIYGKK	100%	59%
					DNKCVFPFIYGK	97%	
					NDYAKCVFPFIYEGK	100%	
					SYDTCIIIGSTFMNYWCSLSSNYDE DG VWK	100%	
					YFDCTLHGSLFLWCSLDADYTGR	100%	
P81187	Complement factor B	85.3 KDa	7.87	100%	AAYYNLSDEISFR	98%	20%
					AGQVLEYLCPSGFYPYPTQIR	100%	
					ALLEVYNMMSR	100%	
					CYDGYTLR	97%	
					DFHINLYQVLPWLK	100%	
					DIEALFVSESKK	100%	
					DVSEVVTPR	100%	
					GDSGGPLIIHK	100%	
					GIPEFYDYDVALVR	100%	
					LQGMENLEDVFVQMLDESR	100%	
					RPQQVPGYAR	100%	
					STGSWSTLQTQDR	100%	

Q9BGU5	Cathepsin D	41.9 KDa	7.33	100%	TLGLCGMVWEHK	98%	37%
					VKDVSEVVTPR	100%	
					YGLVTYATEPK	100%	
					YLLDIGR	99%	
					AIGAVPLIQGEYMIPCEK	100%	
					AQPGGELMLGGTDSK	100%	
					DYAISPEDYALK	100%	
					ISVNNVLPVFDNLMQQK	100%	
					LLDIACWTHR	100%	
					NVFSFFLNR	100%	
					QGPIPELLK	100%	
					QPGVVFIAAK	100%	
					TMSEAMGPVEHLIAK	100%	
					VGLAEAAR	100%	
					VSSLPQVTVK	100%	
					YATGEPAVR	99%	
					YYTVFDRDQNR	97%	
L8ICQ2	5'-nucleotidase	62.5 KDa	6.61	100%	ECNMGNLICDAMINNNLR	100%	36%
					ETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDK	100%	
					EVNFPILSANIK	100%	
					EVPAGQYPFIVTSDDGR	100%	
					GTEVAHFMNALGYDAMALGNHEFDNGVEGLIDPLLK	100%	
					HDSGDQDINVVSGYISK	100%	
					IIALGHSGFEVDK	100%	
					IKHDSGDQDINVVSGYISK	100%	
					ILTVGDEVVGIVGYTSK	100%	
					ISGLYSPYK	100%	

F1MGQ1	Deoxyribonuclease	35.1 KDa	9.37	100%	KVPVVQAYAFGK	100%	53%
					LEVLCTQCR	100%	
					TIVYLDGTAQSCR	100%	
					VILPSFLVSGGDGFR	100%	
					VLYPAVEGR	100%	
					VPSYEPLR	99%	
					VPVVQAYAFGK	100%	
					YLGYLK	97%	
					ALDVSDHFPVEFK	100%	
					ANCNAMDVIVK	100%	
					DFVIVPLHTTPETSVR	100%	
					EIDELADVYTDVKR	100%	
					EPFVVWFQSPYTAVK	98%	
					EQYAFLYK	97%	
					FVWLIGDQEDTTVKK	100%	
					KGITYNYVISSR	100%	
					GITYNYVISSR	100%	
					GQNIVNSVVPQSNLVDFQK	100%	
					ICPTLMEK	96%	
					ICSFNVR	98%	
E1BDF3	Matrilin 4	64.3 KDa	5.59	100%	KANCNAMDVIVK	99%	36%
					NTYKEQYAFLYK	97%	
					QSYLYHDYQAGDADVFSR	100%	
					RCDIILLMEIK	98%	
					AKEEGIVMYAVGVGK	99%	
					EGHVDLVLLVDGSK	99%	
					EGYDLLPDGR	100%	
					FVNQIVDFLDVSPEGTR	100%	

					GIEIYAVGVQR	100%	
					GSICPEEGIGAGTELK	100%	
					GTMTGLALR	99%	
					LEDLENQLATQK	100%	
					QAVLAVEYMER	100%	
					QFLVGLLR	100%	
					SPCECESLVEFQGR	100%	
					SQDNISVWAAR	100%	
					SVRPFEFETMR	100%	
					TEFPLGR	99%	
					VAVIVTDGRPQDR	99%	
					VGLVFTDGR	100%	
					VGVIQYSSQVQSVFPLR	100%	
					DNENEITGIR	100%	
					FGSSWSEK	99%	
					GGGSYFSTTK	100%	
					HLVIHTSYGR	100%	
M5FKI8	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like	16.9 KDa	8.71	100%	LLGISSIGFDWDYPIVR	100%	73%
					SFSAFPDGSEK	100%	
					VFIGIGGIK	100%	
					VLTGVFGQHK	100%	
					YGAPGGTLQEFVLQSGEYITGVDGSYK	100%	
					AKDLVASLSK	100%	
					DQGNEVNIGR	100%	
Q32LF7	Beta-1,4-galactosyltransferase 4	39.4 KDa	9.34	100%	GTVTDEAFVEK	100%	47%
					ITRPLPEVGK	100%	
					KGTVTDEAFVEK	100%	
					LDNCPSVSPHLK	98%	

					LVFKPDLTLEEVQAK	100%	
					MNLLHQVSR	100%	
					QLDYGIVYIHQAGSK	100%	
					VAILIPHR	100%	
					VNGFSNNYWGWGGEDDDL	99%	
					YSGYFGGVLTALSR	100%	
					YTMIFHK	98%	
					AGFEDMR	100%	
					APLDVVAGFNVPLFK	100%	
					DVVVAIIAALIHSGK	100%	
					IHLMNSDIGVFNP	100%	
					ILTSILLPNENGK	99%	
					IMSQTTPMLILDQGN	100%	
					KDVVVAIIAALIHSGK	100%	
					LDFISPVIDHSVVHLILGAR	100%	
					LFNVAGDSLNLPTLNQTPFR	100%	
					VISLLTPALPK	100%	
F1MLW2	BPI fold-containing family B member 1	51.7 KDa	8.87	100%	LFNVAGDSLNLPTLNQTPFR	99%	50%
					LLNNITTK	100%	
					LSFLLK	99%	
					LTVLLDYVLPEVAR	100%	
					LVLSECSNTGGSLR	100%	
					NHDVTNTLQQLPLLAMEEESSR	100%	
					SGIPVSMVK	97%	
					SISLSLTK	100%	
					VIDETAAAQLGPTQIVK	100%	
					VPMSLNSEHLK	99%	

P31096	Osteopontin	30.9 KDa	4.49	100%	VTSASIGQLQVQPLANGR	100%	31%
					GDSVAYGLK	100%	
					HSNLIESQENSK	100%	
					ISHELDSASSEVN	100%	
					LSQEFHSLEDK	100%	
					QLNNKYPDAVATWLKPDPSQK	100%	
Q6R8F2	Cadherin-1	97.9 KDa	4.75	100%	YPDAVATWLKPDPSQK	100%	7,0%
					DTANWLEINPETGAISTR	97%	
					ETGVISVLTTGLDR	98%	
					TVYVSDDTR	100%	
					VHTDGVLTVR	100%	
					VSFEGCAGLPR	100%	
Q29443	Serotransferrin	77.7 KDa	6.75	100%	DKPDNFQLFQSPHGK	100%	30%
					DNPQTHYYAVAVVK	100%	
					DQTVIQNTDGNNNEAWAK	100%	
					EDVIWELLNHAQEHFGK	100%	
					ELPDPQESIQR	100%	
					FDEFFSAGCAPGSPR	100%	
					GEADAMSLDGGYLYIAGK	100%	
					GYLAVAVVK	100%	
					ILESGPFVSCVK	100%	
					KTYDSYLGDDYVR	100%	
					LCQLCAGK	98%	
					NYELLCGDNTR	99%	
					TAGWNIPMGLLYSK	100%	
					TSDANINWNNLK	100%	
					TYDSYLGDDYVR	100%	
					YYGYTGAFR	97%	

P02784	Seminal plasma protein PDC-109	15.4 KDa	4.91	100%	CVFPFIYGGK	100%	43%
					DYAKCVFPFIYGGK	100%	
					IGSMWMSWCSLSPNYDKDR	100%	
					KHFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR	100%	
E1BN79	Carboxylic ester hydrolase	64.3KDa	5.83	100%	AIMESGVAIIPYLK	100%	21%
					ELLSINQK	99%	
					FVFGGAFLK	99%	
					GLPLWPAYR	98%	
					GNIVMFEEATEEEK	100%	
					HSLVDIR	100%	
					LGIFGFFNTGDEHAR	100%	
					LKELELK	100%	
					VSEDCLYLNİYAPAHAE TGSK	99%	
E1B748	Hypoxia up-regulated 1	111.6 KDa	5.26	100%	VVDGLFFPNEPLDLLAQK	100%	25%
					AANSLEAFIFETQDK	100%	
					AEFEELCADL FER	98%	
					AHFNLD E SGVLSLDR	100%	
					DAGIQPQLQIR	99%	
					DAVIYPILVEFTR	100%	
					EVEEETGVR	100%	
					EVQYLLNK	97%	
					FFGDSAASMAIK	100%	
					KTPVTVTLK	100%	
					LCHGLFFR	99%	
					LDEIEQVILVGGATR	98%	
					LPATEKPVLLSK	99%	
					LQDLTLR	99%	

					SLAEDFAEQPIK	100%	
					TLGGLEMELR	99%	
					TPVTVTLK	100%	
					VAIVKPGVPMEIVLNK	99%	
					VESVFETLVEDSPREEESTLTK	100%	
					VLQLINDNTATALSYGVFR	100%	
					YFQHLLGK	99%	
P00669	Seminal ribonuclease	16.3 KDa	9.32	100%	CKPVNTFVHESLADVK	100%	44%
					HIIVACGGKPSVPVHFDASV	99%	
					QHMDSGNSPSSSSNYCNLMMCCR	100%	
					YPNCAYK	99%	
A7E3W2	Galectin-3-binding protein	62.1 KDa	5.39	100%	ALLHCEGSFVVDVIDFK	98%	25%
					EVEALVGQVR	100%	
					GCDLFITVK	100%	
					GVYTLDLSGELPAALEQIFESQK	100%	
					LILSTNPEAHGLWK	100%	
					LYTSPTWSQSVMSSSYNPSR	100%	
					RIDVSLSSVK	100%	
					STSLFPCPSGVFSR	100%	
					TELVVPSELVLLLAVDK	100%	
					VREEDEIAMCAHK	100%	
VTMEVDAECVPVVK	100%						
P79345	NPC intracellular cholesterol transporter 2	16.7 KDa	8.25	100%	AVVHGIVMGIPVPFPIESDGCK	100%	54%
					DCGSWVGVIK	100%	
					DKTYNYVVK	99%	
					EVNVSPCPTQPCK	99%	
					FKDCGSWVGVIK	100%	
					LPVKNEYPSIK	100%	

					VVVEWELTDDKNQR	100%	
					NEYPSIK	100%	
					FEELNMDLFR	100%	
					IEWLESHQDADIEDFK	99%	
					IINEPTAAAIAYGLDKR	100%	
					ITPSYVAFTPEGER	100%	
					LTPEEIER	99%	
					MKETAEAYLGK	100%	
Q0VCX2	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	72.4 KDa	5.07	100%	NQLTSNPENTVFDK	100%	30%
					SDIDEIVLVGGSTR	99%	
					SQIFSTASDNQPTVTIK	100%	
					VEIANDQGNR	100%	
					TFAPEEISAMVLTK	99%	
					TKPYIQVDVGGGQTK	99%	
					TWNDPSVQQDIK	99%	
P55206	C-type natriuretic peptide	13.2 KDa	10.25	100%	TPGGGGANLKDDR	100%	28%
					TPSGEEVAEPQAAGGGQK	100%	
					EGDEVYVLGAFAGLHGR	100%	
					ELCCHLSYR	100%	
					FEVLEDGR	100%	
					FGHTPVQAR	97%	
					ILFAEVDSHPR	100%	
F1N3U5	Vanin 2	52,6 KDa	7.25	100%	MTGSGIYAPHSPK	100%	23%
					LAPEKFEVLEDGR	100%	
					NGLSEPVLTVSLFGR	100%	
					QAAEQGAQIIVTPEDALYGWK	100%	
					STDVTTGQPVETALTR	100%	
					YHLYR	96%	

P82292	Spermadhesin Z13	13.3 KDa	5.58	100%	DSTDGLLVKDK	100%	53%
					ESLEIEGPPESSNSR	100%	
					KICDTSHA EYTSCTNTMTVK	100%	
					KPNHPAPDFFLIFR	100%	
Q3ZBZ1	45 kDa calcium-binding protein	41.1 KDa	4.79	100%	AVDPDGDGHVSWDEYK	100%	31%
					DFHQEVFLGK	100%	
					GMLQFMVK	100%	
					KLMVIFSK	100%	
					LEMDGHLNK	100%	
					TAEHFQEAVAESR	100%	
					YSEFFTGSK	100%	
Q3ZCH5	Zinc-alpha-2-glycoprotein	33.8 KDa	5.11	100%	AREDIFMETLSDIMDYK	100%	48%
					AYLEEECPGMLR	100%	
					CLAYDFYPR	100%	
					EGFPSFQAVAYLNDQPFFHYNSEGR	100%	
					EGSHTFQGAFGCELR	100%	
					EIPAWVPLDPAAQNTK	100%	
					FDKEIPAWVPLDPAAQNTK	100%	
					KWEAEAVYVQR	100%	
					YLPYSR	97%	
					QESPSVSVTGHAAPGHK	100%	
					SIGLHWTR	98%	
P63258	Actin, cytoplasmic 2	41.7 KDa	5.31	100%	SLTRPLTVPWDPR	100%	36%
					AGFAGDDAPR	100%	
					AVFPSIVGRPR	99%	
					DLTDYLMK	100%	

					DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	100%	
					EITALAPSTMK	100%	
					GYSFTTTAER	100%	
					HQGVMVGMGQK	100%	
					IIAPPER	97%	
					IWHHTFYNELR	100%	
					QEYDESGPSIVHR	100%	
					RGILTLK	100%	
					SYELPDGQVITIGNER	100%	
					VAPEEHPVLLTEAPLNPK	100%	
Q5E998	Cathepsin L2	37.3 KDa	6.55	100%	AQGNQGCNGGLMDNAFYIK	100%	36%
					IIDLHNQEYSEGK	100%	
					LDPNLDAHWHQWK	98%	
					LFHEPLLVDVPK	100%	
					LVSLSEQNLVDCSR	100%	
					LYGMNEEEWR	100%	
					MAMNAFGDMTNEEFR	100%	
					RLYGMNEEEWR	99%	
					SGIYYDPDCSSK	100%	
F1MCF5	Glutathione peroxidase	15.6 KDa	8.87	100%	FLVGPDGVPVMR	100%	54%
					NSEILMGLK	100%	
					SDMLEYLK	100%	
					VFTFLK	100%	
H7BWW2	Beta-hexosaminidase	61.2 KDa	7.64	100%	YVRPGGGFVPNFQLFEK	100%	22%
					AGPSCAVLQEAFR	100%	
					GILIDTSR	99%	
					GPVATLTANR	100%	
					GSYSLSHVYTPNDVR	97%	

					LFYLSPGNFFFGHSPTSK	98%	
					LLPGTVVQVWK	100%	
					LWSPQEVTDLDDAYR	100%	
					VLPEFDSPGHTEWGK	100%	
					SIVWQEVYDDEGK	98%	
					TLDAMAFNK	100%	
					VWGVLR	98%	
					YYDYIFGFYK	99%	
G3N0V0	Uncharacterized protein	35.9 KDa	8.05	100%	AVGVSIDCSK	100%	31%
					EPQVYVLDPPKEELSK	100%	
					EPSVFIFPPKPK	100%	
					GLSAPIVR	100%	
					VVSALPIQHQDWTGGK	100%	
					VYPLASR	99%	
P13600	Beta-nerve growth factor	26.6 KDa	9.72	100%	GKEVMVLGEVNINNSVFK	100%	30%
					HWNSYCTTHTFVK	100%	
					IDTACVCVLSR	100%	
					LQHSLDTVLR	100%	
					QYFFETK	99%	
W5P198	Vasoactive intestinal peptide	19.1 KDa	5.48	100%	ADTDILEDALAENDTPYYDVS	100%	71%
					HADGVFTSDYSR	100%	
					HSDAVFTDNYTR	100%	
					IPFEGANEPDQVSLK	100%	
					KYLESIGK	99%	
					MGDRIPFEGANEPDQVSLK	100%	
					SSEGESPDFLEEELEK	100%	
					VSNSISEDQGPIKR	100%	
					YLESIGKR	100%	

L8HZP9	Angiotensin-converting enzyme	141.4 KDa	6.13	100%	ENYNQEWWSLR	100%	10%
					FHIPASVPYVR	100%	
					GPQFGSEVELR	100%	
					IAFIPFSFLVDQWR	100%	
					INLLSSGDGGYEEDINFLMK	100%	
					LEGPFGVSGR	100%	
					LEPDLTNLMATSR	100%	
					LGFSQPWPEAMR	100%	
					LLADAMK	100%	
					MDATEAMIK	100%	
					QGWTPLR	100%	
					SILPYFPK	99%	
					VFDGSVTR	98%	
					VNFLGLNLEEQQAR	100%	
YQGVCPPLAR	100%						
Q58DP6	Ribonuclease 4	16.9 KDa	9.04	100%	FNTFIHEDLWNIR	100%	52%
					NGQMNCHEGVVR	98%	
					QHVDPDETGGNDSYCNLMMQR	99%	
					RFNTFIHEDLWNIR	99%	
					RVVIACEGNPEVPVHFDK	100%	
					SICSTTNIQCK	100%	
					VVIACEGNPEVPVHFDK	100%	
G3N2N9	Glutathione peroxidase	25.0 KDa	8.19	100%	FLVGPDGIPVMR	100%	36%
					GTIYDYDAFTLNGK	99%	
					HISWEPIMVR	100%	
					QEPGENSEILPGLK	97%	
					QSCPHPSEIMGSIK	96%	
					TDILAYMK	100%	

Q9XSC9	Transcobalamin-2	47.9 KDa	9.22	100%	VFTFLK	99%	30%
					AALQASLQHK	100%	
					ALLEPALETPPQAK	100%	
					DGETIELR	100%	
					DPDTPLQQGIADYRPK	100%	
					EFWQVLR	98%	
					FIDVLLK	100%	
					HSVSVPAGSSLEDILK	99%	
					INLALKR	100%	
					LLPWMDR	99%	
					TFQNPLMISQLLPVLNQK	100%	
					TQASLSGPFLTSVLGR	100%	
					VSGISPSYR	100%	
L8IXW5	Proactivator polypeptide	58.8 KDa	5.05	100%	DVITAAGNLLK	100%	21%
					EIVDSYLPVILDMIK	100%	
					EQILAALEK	100%	
					GCSFLPDQYR	100%	
					IGACPAAHKPLLGAEK	97%	
					KLVGYLDR	99%	
					LPGMSDMCK	100%	
					LVGYLDR	96%	
					TLVPAEVVSENVIPALELVEPIKK	100%	
Q2HJF0	Serotransferrin-like	69.1 KDa	8.21	100%	CLQDGVGDVSFVR	100%	31%
					DDPQTHHYVVAVVK	98%	
					DLLFSDDTECLANLQDR	100%	
					DLLFTDSAIGFLR	100%	
					EPYFGYSGAFK	100%	
					GSNFQLNQLQGK	100%	

E1BH06	Uncharacterized protein	192.7 KDa	7.20	100%	GYVVAVVK	100%	13%
					HPTVLQNTDGKNPEAWAK	97%	
					YLGPEYLQAIANVK	100%	
					MLFNQQELFGR	100%	
					KPVTEAQSCHLAIVPSHAVVSR	97%	
					LCQLCAGK	98%	
					LYLGYEYFSVIQHLGR	100%	
					MLLPSDWSQEAAAK	100%	
					SAEFQLFYSPHGK	98%	
					SDANLTWNSLR	100%	
					SELLDACTFHGN	100%	
					SVDGKEDLIWELLSQAQEHFGK	99%	
					TSYLCIR	99%	
					WCTVSNLEASK	99%	
					AEFQGVLEK	99%	
					AELADQAASWLTR	100%	
					ALVALGAVDTALYAVGGK	100%	
					AMELLQEEDLIEEDDIPVR	100%	
					DGSYGAWLHR	100%	
					DSSTWLTAFLVK	100%	
					FLLGEDGEK	100%	
					GDPQYLLDSNSWIEEMPSEK	100%	
					GHLFLQTDQPVYNPGQR	100%	
					IGVPLSVAVK	100%	
					ILSLAQDQVGGSSEK	100%	
					ITQVLHFTK	100%	
					LELNVDSSK	100%	
					LLLFSPSVVR	100%	

					LQDAPSGQVVR	97%	
					LQETATWLLSQQR	100%	
					LVDGQCQISLQK	100%	
					SHVLQLTNHQVHR	100%	
					VTASDPLEALGSEGALSPGGLASLLR	100%	
					YVLPNFEVK	97%	
A0A0M4B6N2	Binder of sperm 3	16.2 KDa	6.54	100%	EMEDIASGAETK	100%	21%
					CVFPFTYK	100%	
A6QNJ8	GANAB protein	109.0 KDa	5.83	100%	ALLDSLQLGPDALTVHLINEVTK	100%	24%
					FGAVWTGDNAAEWDHMK	100%	
					FSFSGNTLVSSADPK	97%	
					GLLNLEHQR	100%	
					IRIDELEPR	97%	
					KLVAIVDPHIK	98%	
					KPGVNVASDWTIHLR	100%	
					LDLLEDR	100%	
					LSFQHDPETSVLILR	99%	
					LVAIVDPHIK	100%	
					LYNLDFVQYELYNR	100%	
					MALYGSPVLLAHSPLR	100%	
					MLDYLQGSGETPQTDVR	100%	
					NPEPELLVR	98%	
					REPWLLPSQYHEIIR	100%	
					SGGIERPFVLSR	100%	
					SLLSVNAR	97%	
					VPDVLVADPPTAGLSVSGR	98%	
					VSLTLGSIWDR	100%	
					WYQMGAYQPFFR	100%	

					YHGPQTLYLPTLSSIPVFQR	99%	
					YRVPDVLVADPPTAGLSVSGR	99%	
					AELQETDLFHHSK	100%	
					AQFDLAFVVR	100%	
					FEMGQVR	99%	
					FLGSGGFIGYAPNLSK	100%	
					FLVEYIAPMTEK	100%	
					IFLDPEKR	99%	
					IFQNLDGALDEVVLK	100%	
					IQALGLGEDWPGEAMLAGGGLK	100%	
O77588	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	83.4 KDa	6.17	100%	LDPDMAFCANIR	100%	22%
					LLIEQNK	100%	
					LQLNYLGNYIPR	96%	
					LVGPEVR	100%	
					LWSNFWGALSADGYEAR	100%	
					LYPGYYTR	96%	
					SEDYVDIVQGR	100%	
					SQVVFSAEELIYPDR	100%	
					VGVDYEGGGCR	100%	
					EVIVVATDYK	100%	
G3MWX7	Uncharacterized protein	11.9 KDa	9.07	100%	FKIPLESGBK	100%	28%
					TYAIMNIILNR	100%	
					AETGNMFLR	100%	
					GVDAQVAALIAR	100%	
					IKPFLGGASTEDLR	100%	
A6QP39	MSLN protein	44.2 KDa	6.61	100%	KLDEFYPQGYPSLIER	100%	26%
					LLGPNLVGLK	100%	
					LTTEAVLSLTVAEVQK	100%	

A4IFC0	PDGFD protein	42.1 KDa	8.14	100%	QVNLIPFTYQQLHIFK	100%	23%
					YVGGGGQLDK	100%	
					RDETIEVTGHGHVQSPR	100%	
					FPNSYPR	100%	
					HMALVDIQLDHER	100%	
					LTNVVFFPR	100%	
					SDDYFVAKPGFK	100%	
					TIAEFDTVEDLLK	100%	
E1BLI4	Uncharacterized protein	15.4 KDa	8.96	100%	YDFVEVEDISETSTVIR	100%	21%
					CTWTILLER	100%	
					FCSGGHLVFR	100%	
					ISSYSSWEPK	100%	
L8HP94	Ig alpha-1 chain C region	36.7 KDa	5.97	100%	SAEGASFTWNPTGGK	100%	18%
					SSLTATIK	100%	
					VDAEVWK	100%	
					WLQGNQELPR	100%	
					YLTWGPLPEAGQSVATFAVTSVLR	100%	
Q0V8B6	Tripeptidyl-peptidase 1	61.3 KDa	6.28	100%	ADPEEELSLTFALR	95%	22%
					ALAPHVDFVGGGLHR	100%	
					GLPPLGFLNPR	100%	
					HGAGLFDVTR	100%	
					LFGGDFAHQASVAR	100%	
					LPPGWVSLGR	99%	
					LSELVQAVSDPGSPR	100%	
					WLLAAGAR	98%	
Q2TBX4	Heat shock 70 kDa protein 13	51.9 KDa	5.18	100%	ILVPIQQVLK	100%	20%
					KLFDTLNEDLFQK	100%	
					LFDTLNEDLFQK	99%	

F1MHF1	ST6 beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	46.2 KDa	9.09	100%	LLQYLYK	100%	28%
					QIYQTYGFLPSR	100%	
					VFTPEELEAEIGR	100%	
					TEIDEVVLVGGSTR	100%	
					VINEPTAAAMAYGLHK	100%	
					ATFQVWDK	99%	
					ATLPGFR	100%	
					EIDDHDAVLR	100%	
					EYQVLQGLEK	100%	
					FSAEALLCHLR	100%	
B5T255	Peptidoglycan recognition protein 1	21.0 KDa	9.62	100%	KGNYEFLK	100%	38%
					LVNSQLVTTEAGFLK	100%	
					NIQALGGPK	100%	
					NPDYSFFNNFK	100%	
					TDVCYYYQR	100%	
					YLNLTDEDIYLLGK	100%	
					AAQSLACGAAR	100%	
					DVQQTLSPGDELYK	100%	
					GYLTPNYEVK	100%	
					IIQQWPHYR	100%	
F1MUF4	Beta-galactosidase	73.4 KDa	7.03	100%	VPPASALR	100%	16%
					YVVVSHTAGSVCNTPASCQR	100%	
					AGATLDLLVENMGR	98%	
					ILTNWEIFPLDMEDAVR	100%	
					QYFGFVLYR	100%	
					SSDPDYLAADVDK	100%	
					RTFQIDYRR	100%	
					SVYPLTFIDVK	100%	

					TVEDALNILCPSPGPIK	100%	
					VNYGSSINDFK	100%	
					YISGSIHYFR	96%	
P37141	Glutathione peroxidase 3	25.6 KDa	6.84	100%	FLVGPDGIPIMR	100%	54%
					LFWPEMK	98%	
					MDILTYMR	100%	
					NSCPPTSELLGSPDR	100%	
					QEPGENSEILATLK	99%	
					YVRPGGGFTPNFQLFEK	98%	
P81265	Polymeric immunoglobulin receptor	82.5 KDa	7.07	100%	AAPAGAAIQR	98%	16%
					CTTLISSEGYVSDDYVGR	98%	
					DNGVFSVHITSLR	100%	
					EDEGWYWCGVK	98%	
					FYSFEK	96%	
					GGSVTVSCYPNPK	100%	
					LSDAGMYVCQAGDDAK	100%	
					SPIFGPEEVTSVEGR	100%	
					SSVTFDCSLGPEVANVPK	100%	
P28291	C-C motif chemokine 2	11.1 KDa	9.57	100%	TVTINCPFTR	97%	18%
					VVQGEPSLK	99%	
					EAVIFK	100%	
D4QBD1	Hemoglobin beta	15.9 KDa	7.02	100%	WVQDSINYLNKK	100%	75%
					AAVTAFWGK	100%	
					EFTPVLQADFQK	100%	
					FFETFGDLSTADAVMNNPK	100%	
					GTFAALSELHCDK	100%	
					LHVDPENFK	97%	

					LLGNVLVVVLAR	100%	
					VKVDEVGGEALGR	100%	
					LLVVYPWTQR	100%	
					VVAGVANALahr	100%	
Q3ZC64	Ephrin-A1	23.8 KDa	6.69	100%	EGHSYYYISKPIHHQEDR	98%	19%
					FTGFTLSK	100%	
					FWNEDYTVHVR	100%	
F1MWI1	Clusterin	42.5 KDa	8.45	100%	LFNSFPITVTVPQEVSSPDFMENAVEK	100%	13%
					TQIEQTNEER	100%	
L8HPF5	Ig gamma-1 chain C region	11.3 KDa	5.89	100%	FSWFVDDVEVNTATTKPR	100%	40%
					IQHQDWTGGK	100%	
					VHNEGLPAPIVR	100%	
Q7YRQ8	Tissue factor pathway inhibitor 2	26.6 KDa	9.06	100%	APVFCYSPK	99%	15%
					IPSYYYDR	100%	
					YYFNPR	100%	
L8HZ66	Phosphoglycerate kinase	44.7 KDa	8.47	100%	AEPDKIEAFR	100%	26%
					AHSSMVGVLNPQK	98%	
					ALENPERPFLAILGGAK	100%	
					FHVEEEGKGQDPSGNK	100%	
					LGDVYVNDAFGTAHR	100%	
					NSVNITFPVDFVTADKFEENAK	98%	
					VDFNVPMK	97%	
					VLNNMEIGASLFDEEGAK	100%	
					YSLEPVAAELK	100%	
Q3ZBD7	Glucose-6-phosphate isomerase	62.8 KDa	7.33	100%	AVLHVALR	100%	18%
					EWFLLSAK	95%	
					HFVALSTNTAK	100%	
					ILLANFLAQTEALMR	100%	

					NLVTETVMQMLVDVAK	100%	
					SNAPILVDGK	100%	
					TFTTQETITNAETAK	100%	
					TLATLNPESSLFIIASK	100%	
					TWYEQHGSDLNLR	100%	
A5PJL8	C1QTNF5 protein	25.3 KDa	6.06	100%	ASLQFDLVK	100%	24%
					VLVNEQGHYDAVTGK	100%	
					VPPPSDAPLPFDR	100%	
P19879	Mimecan	34.2 KDa	5.43	100%	DFADIPNLR	100%	26%
					ESAYLYAR	100%	
					LDFTGNLIEDIEDGTFSK	100%	
					LSLLEELTLAENQLLK	100%	
					LTLFNAK	97%	
					RLDFTGNLIEDIEDGTFSK	100%	
Q95M18	Endoplasmin	92.4 KDa	4.76	100%	ELISNASDALDKIR	100%	13%
					FAFQAEVNR	100%	
					GTITLVLK	100%	
					GVVDSDDLPLNVR	100%	
					LIINSLYK	98%	
					LSLNIDPDAK	99%	
					NLLHVTDGTGVGMTR	100%	
					SILFVPTSAPR	100%	
					YNDTFWK	100%	
					YSQFINFPIYVWSSK	100%	
B0JYQ0	ALB protein	69.2 KDa	5.95	100%	AEFVEVTK	100%	43%
					DAFLGSFLYEYSR	100%	
					EACFAVEGPK	99%	
					EYEATLEECCA	100%	

					FKDLGEEHFK	100%	
					HLVDEPQNLIK	100%	
					HPEYAVSVLLR	100%	
					LGEYGFQNELIVR	100%	
					MPCAEDYLSLILNR	100%	
					HPYFYAPELLYYANK	100%	
					KQTALVELLK	100%	
					LCVLHEK	100%	
					LFTFHADICTLPDTEK	100%	
					LVNELTEFAK	100%	
					NECFLSHKDDSPDLPK	100%	
					QTALVELLK	100%	
					RHPEYAVSVLLR	100%	
					RHPYFYAPELLYYANK	100%	
					SLHTLFGDELCK	100%	
					TVMENFVAFVGK	100%	
					VPQVSTPTLVEVSR	100%	
					YICDNQDTISSK	100%	
					ALGMVDAFIFR	100%	
					EVDLYLPR	100%	
					FLQEYLDNVQK	100%	
					FVSLEDVQAK	100%	
A6QPZ4	SERPINB4 protein	38.6 KDa	6.19	100%	FYLASVESADFK	100%	29%
					ILEIPYK	100%	
					LIAWTSPQNMR	100%	
					STDAYELSVANR	100%	
					VANFSGMTGSGDLAISK	100%	

Q3SX14	Gelsolin	80.7 KDa	5.54	100%	AGALNSNDAFVLK	100%	14%
					AQPVQVAEGSEPDSEALGGK	100%	
					DSQEEKTEALTSK	100%	
					EPGLQIWR	100%	
					EVQGFESATFLGYFK	100%	
					HVVPNEVVVQR	98%	
					QTQVSVLPEGGETPLFK	100%	
					SEDCFILDHGK	100%	
					TGALELLR	100%	
					TPSAAYLWVGAGASEAEK	100%	
P81134	Renin receptor	39.4 KDa	5.35	100%	ANSVFEDLSVTLR	100%	32%
					ATVMVMVK	100%	
					DHSPDLYSLELAGLDEIGK	100%	
					DISSLLSR	100%	
					EDLSWPGLA VGNLFHRPR	100%	
					IPDVAALSMGFSVK	100%	
					NNEVDLLFLSELQVLR	100%	
					LFQENSVLTSLPLNSLSR	100%	
U5Y6U2	Osteopontin	31.0 KDa	4.49	100%	SPGSVVFR	99%	32%
					GDSVAYGLK	100%	
					ISHELDSASSEVN	100%	
					LLNNKYPDAVATWLKPDPSQK	100%	
					LSQEFHSLEDK	100%	
					RSNVESPDATEDFTSHIESEEMHDAPK	100%	
E1BMJ0	Factor XIIa inhibitor precursor	51.7 KDa	6.20	100%	YPDAVATWLKPDPSQK	100%	18%
					FHPHTLTMPR	100%	
					FPVFMGR	100%	
					KYPVASFTDR	100%	

					LLDSLPEPTR	100%	
					LYQDFSVLK	100%	
					SAEAVLGEALTDFSLR	100%	
E1BI74	NAD(P)(+)-arginine ADP- ribosyltransferase	33.7 KDa	7.77	100%	ALHFYLTR	97%	23%
					EMADHALLR	100%	
					EPGQVVFR	100%	
					LGQFTSSSLDETVAR	100%	
					TCFGAPIQALSVPFK	100%	
					TGGGSWESYMNHFPEK	100%	
A0JNP2	Secretoglobin family 1D member	11.2 KDa	8.38	100%	LIITNILGK	100%	20%
					YNAPPEAVAAK	100%	
P01888	Beta-2-microglobulin	13.6 KDa	7.79	100%	HVTLEQPR	100%	47%
					IKSEQSDLFSK	100%	
					IQVYSR	100%	
					SEQSDLFSK	100%	
Q3T0Z0	WAP four-disulfide core domain 2	12.7 KDa	4.31	100%	ACVLDEDCDDNLK	100%	22%
					DQCQVDSQCPDALK	100%	
A6QPK0	Mammaglobin-A precursor	10.4 KDa	4.95	100%	DFAQTDVEK	100%	37%
					QMLQIYDSIYCK	100%	
					SVDPTVSKDEYR	100%	
P07688	Cathepsin B	36.6 KDa	5.69	100%	AGHNFYNVDLSYVK	100%	26%
					EIMAEIYK	97%	
					EQWPNCPTIK	99%	
					KLCGAILGGPK	100%	
					NGPVEGAFSVYSDFLLYK	100%	
					SGVYQHVSGEIMGGHAIR	100%	
					SSLYFPPLSDELVNFNK	99%	

A6QNX2	DPP7 protein	53.6 KDa	5.07	100%	AVQDAFR	96%	12%
					DLTQLFGFAR	100%	
					GSHPD DPASVVEAR	100%	
					RLEAALIGK	100%	
					SLPFGER	97%	
W0UVF3	Ribonuclease A M1	17.7 KDa	9.60	100%	NGFVDVVEDMR	100%	32%
					NVYIWAPYPFK	100%	
					QHHLSPNWEFSK	100%	
P02672	Fibrinogen alpha chain	66.9 KDa	6.73	100%	DIQYLPLIK	100%	19%
					GDSVSQGTGLAPGSPR	100%	
					GLIDEVDQDFTSR	100%	
					GNLDDFFHR	100%	
					MSTITGPVPR	100%	
					MVLETFGGDGHAR	100%	
					NIVELMR	100%	
					QLEQVIINLLPSR	100%	
					SQLQEAPLEWK	100%	
					TGLAPEFAALGESGSSSSK	100%	
A2I7M9	Serpine A3-2	46.2 KDa	5.67	100%	DTQSIIFLGK	100%	15%
					GSTLTEILEGLK	100%	
					IHELYLPK	100%	
					LTPETLTR	100%	
					TVEVPMMTLDLETPTYFR	97%	
					VNRPFIAVVLK	98%	
P25326	Cathepsin S	37.1 KDa	6.85	100%	DPTLDHHWDLWK	100%	19%
					GPVSVGIDASHSSFFLYK	100%	
					LPDSMDWR	99%	

Q7SIH1	Alpha-2-macroglobulin	167.5 KDa	5.71	100%	LVSLSAQNLVDCSTAK	100%	11%
					NSWGLHFGDQGYIR	100%	
					VPSQWPR	100%	
					YIELPFGSEEALK	100%	
					ALLAYAFALAGNQER	100%	
					ASFSVLGDILGSAMR	100%	
					DMYSFLQDMGLK	100%	
					FEVQVR	96%	
					GATEITTTITK	100%	
					GNSEGNTWLTAFVLK	100%	
					IQEEGTEVELTGK	100%	
					IQHHTLLASPVR	100%	
					LSFVTVDNLRL	100%	
					LLIYAILPDGEVVGDSAR	97%	
					NALFCLDSAWK	100%	
					SLFTDVVAEK	100%	
					TQTVQAHYVLK	100%	
					VFQPFVELTMPYSVIR	100%	
					VSESLSLK	98%	
					VTASPQSLCALR	97%	
F1N7D7	Dystroglycan	97.3 KDa	8.60	100%	GFSEVEPHNMK	100%	9,0%
					GVHYISVSAAR	100%	
					LFDMSAFMAGPGNAK	100%	
					LGCALNQNSVDIR	100%	
					LVPVVNNR	96%	
					VTIPTDLIASNGEVIK	100%	
Q3MI05	Lysosomal protective protein	53.9 KDa	5.92	100%	VVENGALLSWK	100%	13%
					ALHIPEQLPR	100%	

					DTVVVQDLGNIFTR	100%	
					EFSHIAFLTIK	98%	
					HEKDTVVVVQDLGNIFTR	100%	
					RPWLVDYGESGEQIAGFVK	100%	
					VWHQTLLR	100%	
					AAQVAVANYNMGSNSDYYR	100%	
Q5DPW9	Cystatin	16.3 KDa	7.63	100%	AHSQLVAGIK	100%	51%
					CDFEILVVPWK	100%	
					DITILR	100%	
					KVGELQELSPNDPQVQK	100%	
					YYLTVDMGSTACR	100%	
E1BG25	Melanotransferrin	80.6 KDa	5.52	100%	ADTDGGLIFR	100%	12%
					GSQVTINTLK	97%	
					IQAGQIDAVTLK	100%	
					LSVMGCDVLR	99%	
					TVGWNVPVGYLVESGR	100%	
					YYDYSGAFR	97%	
P01966	Hemoglobin subunit alpha	15.1 KDa	8.07	100%	AVEHLDDLPGALSESDLHAHK	100%	52%
					FLANVSTVLTSK	100%	
					LRVDPVNFK	100%	
					MFLSFPTTK	100%	
					TYFPHFDSLHSGSAQVK	99%	
					VGGHAAEYGAEALER	100%	
P34955	Alpha-1-antiproteinase	46.1 KDa	6.05	100%	VDPVNFK	99%	20%
					AALTIDEK	100%	
					DFHVDEQTTVK	100%	
					LSISETYDLK	100%	

A5PKI3	Protein FAM3C	24.7 KDa	8.75	100%	LVDTFLEDVK	100%	42%
					NLYHSEAFSINFR	100%	
					SVLGDVGITEVFSDR	100%	
					VLDPNTVFALVNYISFK	100%	
					AIQDGTIVLMGTYDDGATK	100%	
					DNWVFCGGK	99	
					GINVALVNGK	97%	
					ICLEDNVLMMSGVK	100%	
					LIAELGSTSITHLGFR	100%	
					MASGAANVVGPK	100%	
Q95M12	Legumain	49.2 KDa	6.12	100%	MDASLG NFLAR	100%	20%
					SALDAVVR	100%	
					TGELIDTR	100%	
					APLTEHACYQTAVSHFR	100%	
					KIVTLVSGSAAEVDR	100%	
					LDLTPSPEVPLSIMK	100%	
					LMQFQGLK	97%	
					LMSTNDLQESR	100%	
					NFLAVLR	100%	
					SHCFNWHNPTYEYALR	95%	
Q5EA54	Solute carrier family 3, member 2	63.1 KDa	4.96	100%	AFLGQEAGNLADLK	100%	18%
					ASSLPTGTSLPAR	100%	
					EDFESLLHSAK	100%	
					FWLQTGVDGFQVR	100%	
					GFVLGPIHK	95%	
					LLIAGTDSSDLQQILR	100%	
					NSLLSLFR	100%	
					VILD LTPNYK	100%	

Q2KJF1	Alpha-1B-glycoprotein	53.5 KDa	5.30	100%	ALWTGALTPGR	100%	12%
					FPLGPVTSTTR	98	
					GAEEQLVPR	98%	
					SLLSELSDPVELR	100%	
					VLSPAGPEAQFELR	100%	
A7MB70	Semaphorin-3C	85.2 KDa	8.90	100%	IIATSQGLLIR	100%	11%
					ILLMDEDQDR	100%	
					NAAEIVQYGVK	100%	
					TSEYFSLSQYPLDYR	100%	
					VNAADGTYNVFLGTDR	100%	
					VYFFFK	96%	
					VYLTFDEL R	100%	
P22226	Cathelicidin-1	17,6 KDa	7.58	100%	WSPWTWASSVR	100%	37%
					AVDQLNEQSSEPNIYR	100%	
					CEGTVTL DQVR	100%	
					LLELDQPPQDDEDPDSPKR	100%	
					QPWAPPQAAR	100%	
Q1LZH9	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	62.7 KDa	8.71	100%	RCEGTVTL DQVR	100%	11%
					IQEPNTFPAILR	100%	
					LMFSNHG SVR	98%	
					SDVLVEYQGEGR	100%	
					TPGVFDPGYR	100%	
					TQMDGMSFLPILK	100%	
					WQTLLSVDDLVEK	100%	
G3MX67	Uncharacterized protein	36,5 KDa	8.01	100%	AAHPQIMDIANR	100%	18%
					ALITVAK	98%	
					IIVDPWK	100%	
					SNFCYSIEECR	100%	

Q17QB3	Acid ceramidase	44.9 KDa	6.95	100%	STGGLLLTIWK	100%	16%
					DAQWVGFIIR	100%	
					GPVPWYTINLDLPPYK	100%	
					GQFETYLR	97%	
					NIVNAFVPSGK	98%	
					NPFFLDDR	100%	
L8IC40	Protein FAM3D	24.0 KDa	8.84	100%	WYVVQTNYDR	100%	29%
					DSWVFLGAQNLK	98%	
					EYINFNMK	98%	
					GLNVVLVDGTTGAVLTQK	100%	
					LFSNLGSTHAK	100%	
					SFDMYSGDASLLTK	100%	
P10152	Angiogenin-1	16.9 KDa	9.10	100%	SPFEQFLK	100%	23%
					GRNDEYCFNMMK	98%	
					SEFQITICK	100%	
					YIHFLTQHYDAKPK	98%	
E1B818	Olfactomedin like 2A	73.6 KDa	8.71	100%	ALAQQQAVIR	100%	10%
					EGHVAYAFDTHGTGDAR	100%	
					ELSSLGLQLLQK	96%	
					LDPGDLSVQR	100%	
					VASQMNTLEESIK	100%	
E1BQ21	Family with sequence similarity 3 member B	26.0 KDa	8.86	100%	AIEALGSTEIR	100%	35%
					FIQSAPSK	99%	
					GFELPAGIQR	97%	
					GINIAIVNYVTGK	99%	
					SLLFMVTHDDGSSR	100%	
					SSWVFVAAK	98%	

E1BHP0	Alpha-mannosidase	115.2 KDa	7.56	100%	FIIVDQEFFR	100%	10%
					LHHLYEADEDPVR	100%	
					LMSAIVQDR	98%	
					LWWDGVASAK	99%	
					SGVALQHRPVVLIR	100%	
					SLTGTWDVSTLHR	100%	
					VGPLELNR	100%	
					SQPVTVNLSVLQGLGSVVSVEER	100%	
					YANTLSYNVR	99%	
L8J3G6	Annexin	38.9 KDa	6.37	100%	ALLGHLEEVVLALLK	100%	22%
					GDRSEELAVNDDLADSDAR	100%	
					GLGTDEDTLNEILASR	100%	
					GTDVNVFTTILTTR	100%	
					ILVALCGRD	100%	
					SEELAVNDDLADSDAR	100%	
					TPAQFDAEELR	100%	
					VLDLELK	98%	
F1N152	Serine protease HTRA1	51.9 KDa	8.08	100%	ESTLNMVVR	100%	13%
					IAPAVVHIELFR	99%	
					LHQPPVIVLQR	98%	
					LPVLLLGR	100%	
					VTAGISFAIPSDK	100%	
					YNFIADVVEK	100%	
Q76LV2	Heat shock protein HSP 90-alpha	84.7 KDa	4.92	100%	ADLINNLGTIAK	100%	15%
					ALLFVPR	100%	
					APFDLFENR	100%	
					DQVANSFVER	100%	
					ELHINLIPNK	98%	

					GVVDSIDLPLNISR	100%	
					HLEINPDHSIIETLR	100%	
					SLTNDWEDHLAVK	98%	
					TLTIVDTGIGMTK	96%	
Q9MYM4	Lysosomal alpha-glucosidase	104.7 FDa	5.30	100%	AGHIIPMQGPALTTTESR	100%	10%
					DHFGDFPAMVQELHQGGR	100%	
					FSETAQQAMR	100%	
					ITLWNR	100%	
					LDMLMETESR	100%	
					LVHVSSEGASLQLR	100%	
					WTQLGAFYPFMR	97%	
					YEVPLETPR	100%	
Q58CQ9	Pantetheinase	56.9 KDa	5.31	100%	DSAPNTLSDLTTQALR	100%	20%
					LFSLKPTSGPVLTVTLFGR	100%	
					MTGSGIYAPDSPR	100%	
					NLDLLEGAVTSASK	100%	
					QNLFLNEDQFNAPK	97%	
					VNFLASNLHYPLK	99%	
G5E604	Uncharacterized protein	11.0 KDa	8.02	100%	YQYNTDVVFDSK	100%	52%
					GNVYNWFQQIPGSAPR	100%	
					QAVLTQPSSVSGSLGQR	100%	
P16116	Aldose reductase	35.9 KDa	5.76	100%	VSITCSGSSSNVGR	100%	13%
					AIGVSNFNHLQVEK	97%	
					ILNKPGLK	96%	
					MPILGLGTWK	100%	
					TTAQVLIR	100%	
Q0IIH5	Nucleobindin 2	49.1 KDa	5.12	100%	VAIDLGYR	100%	11%
					EHVMNEVDTNKDR	100%	

					ELDLVSHHVR	99%	
					IEPPDTGLYYDEYLK	100%	
					LEYHQVVQQMEQK	97%	
					LVTLDEFLK	100%	
					NEEDDMVEMEEER	100%	
					QVIDVLETDSHFR	100%	
					APEIANSHVEYSVR	99%	
					VDIGLIK	99%	
Q2TBU0	Haptoglobin	44.8 KDa	7.83	100%	VGYVSGWGR	100%	14%
					VTSILDWVR	100%	
					YVMLPVADQDK	100%	
					AQDHFILYCDGELDGR	100%	
					AVTTDQDVPGK	100%	
F1MS23	Lipocalin 1	19.7 KDa	4.62	100%	EVLVLPLR	100%	41%
					NQENSPEAWEEFTEFAK	100%	
					NQESVTAMTFSVLEGGDLEAK	100%	
					DVTELYLEGNHILTAVPK	97%	
Q1RMN8	Immunoglobulin light chain, lambda gene cluster	24.5 KDa	7.54	100%	GSYSCEVTHEGSTVTK	100%	28%
					INNELQDFK	100%	
					IPSHLPEYVTDLR	99%	
					LDLSENQILGIPR	97%	
					LITVNFVGK	100%	
					LLSLYDNR	100%	
L8J3B9	Slit-like protein 3 protein	155.0 KDa	7.93	100%	LNDNEISVLEATGIFK	100%	10%
					SLTSLVLYGNK	99%	
					VNTFQDLQSLSLSLYDNK	100%	
					VSITCSGSSSNIGR	100%	
					YAASSYLSLTSSDWK	100%	

E1B6Z6	Lipocalin 2	22.9 KDa	9.35	100%	DDLCDYWIR	100%	47%
					ENFINFAK	100%	
					IPLQPNFQADQFQGK	100%	
					ITLYGR	100%	
					SLGLTDDHIVFTVPIDR	100%	
					TFVPSSQPGQFTLGNIK	100%	
					VVNTDYNQFAIVYFK	99%	
					WYTVGVAGNAIK	100%	
					ETQGSGLPLPGTIVTTSR	100%	
Q17QC7	Nectin cell adhesion molecule 2	43.2 KDa	5.95	100%	LLPVILSVR	100%	13%
					LSFVNTAPSSGAGQGSELEVR	97%	
					VQVAAEVR	100%	
					VSWLSPLDGEAK	100%	
					YTVTPLSEADGVK	98%	
A5D7U1	Placenta-expressed transcript 1 protein	26.6 KDa	9.49	100%	INIYTVNSLR	100%	16%
					KSSLIHISPDIYK	100%	
					SVIGSWENPSDHCEGR	99%	
Q8SPU5	BPI fold-containing family A member 1	26.5 KDa	6.13	100%	ITNPQLLELGLVQSPDGHR	100%	21%
					LYVTIPLGMILNVK	99%	
					TSLVGSLLK	96%	
					VTSLTPLLNNIELK	100%	
L8IEA1	Beta-hexosaminidase subunit beta	51.6 KDa	8.48	100%	AGPSCAVLQEAFR	100%	20%
					DLNLWPLPLSVMTTPR	100%	
					GILIDTSR	100%	
					GPVATLTANR	100%	
					LLYLSPR	100%	
					TLDAMAFNK	100%	

					VWGVLR	99%	
					YYDYIFGFYK	98%	
E1BBK6	Nephronectin	65.0 KDa	8.47	100%	DPAGGQYLTVSAAK	99%	14%
					GDVFIPR	100%	
					GFDLMYIGGK	100%	
					IDCCWGWAR	100%	
					QIVSSIGLCR	100%	
					QPSNDLFEIFEIER	97%	
					VMIEPSGPIHVPK	100%	
					VTGLHSGTLQVLVR	100%	
P02676	Fibrinogen beta chain	53.3 KDa	8.45	100%	GGWTVIQNR	97%	14%
					HQLYIDETVK	100%	
					ISQLTNMGPTK	96%	
					LLIEMEDWK	100%	
					TSSSTFQYITLLK	97%	
					VTALYEGFTVQNEANK	100%	
L8IAF4	Ig lambda-1 chain C regions	11.1 KDa	8.83	100%	GSYSCEVTHDGSTVTK	100%	34%
					SPPSVTLFPPSTEELSANK	100%	
G5E5T5	Uncharacterized protein	42.4 KDa	4.89	100%	AEVLSPVVSFVPPR	99%	12%
					AYSMLTITER	100%	
					DFVPNSVSFSWK	96%	
					FWTFPEVLR	100%	
					QISLSWFR	100%	
					SSLICQATDFSPK	100%	
P15497	Apolipoprotein A-I	30.2 KDa	5.71	100%	EQLGPVTQEFWDNLEK	100%	23%
					LLDNWDTLASTLSK	100%	
					LSPLAQELR	100%	
					QGLLPVLES�K	100%	

					VAPLGEEFR	95%	
					VSILAAIDEASK	96%	
P40682	V-type proton ATPase subunit S1	51.7 KDa	4.97	100%	EVLMGNDEVIGQVLSTLK	100%	16%
					LGASPLHVDLATLQELK	98%	
					LPYTASSGLMAPK	100%	
					LSIEDFTAYGGVFGNK	100%	
					NVLLFLQDK	98%	
P38657	Protein disulfide-isomerase A3	596.9 KDa	6.23	100%	ELSDFISYLK	100%	15%
					FVMQEEFSR	100%	
					GFPTIYFSPANK	100%	
					LAPEYAAAATR	100%	
					TADGIVSHLK	99%	
Q9BEG4	Putative alpha-2,3-sialyltransferase	37.2 KDa	9.10	100%	YGVSGYPTLK	100%	22%
					APTAGFEADVGR	100%	
					ELFQVVPGDVDPLLEK	100%	
					ESWYGPQIDSHDFVLR	96%	
					NALLEEDTYNWWLR	100%	
Q1JPB0	Leukocyte elastase inhibitor	42.2 KDa	5.70	100%	VSSWFDER	100%	22%
					YVFDSWLQGHGR	100%	
					EWTRPESLDLLEVR	98%	
					FKLEESYDLQEPLAR	98%	
					HKPSSNILFLGR	99%	
F1MX50	Cellular repressor of E1A stimulated genes 1	23.9 KDa	6.89	100%	IEQQLTLEK	100%	26%
					IPELLASGMVDSLTK	100%	
					VLELPYEGK	100%	
					GHGDWDAAELLPLPPR	99%	
					GRPFADVLSLSDGPPGK	100%	
					NSLFIR	96%	

P00570	Adenylate kinase isoenzyme 1	21.6 KDa	8.40	100%	TWPSSHNWFFAK	98%	26%
					VSETEMDVAK	100%	
					ATEPVIAFYEK	98%	
					GQLVPLETVLDMLR	99%	
					IIFVVGGPGSGK	100%	
A0A0A0MP92	Serpine A3-7	47.0 KDa	5.82	100%	YGYTHLSTGDLLR	100%	14%
					DILSQLGIK	100%	
					ETQSIIFLGK	100%	
					IFTSDADFSGITDDHK	100%	
					LTPETLTR	99%	
A3KMY8	Beta-glucuronidase	74.4 KDa	6.00	100%	FDFFNAGLHR	100%	9,0%
					GLLQQYHVVDQK	100%	
					KELDGLWSFR	100%	
					LTAQTAVGPVSDFYTLPGIR	100%	
					LVQSGPLSSCR	99%	
L8IQM7	Vitamin K-dependent protein S	75.1 KDa	5.29	100%	SAAFLLR	97%	7,0%
					FSAEFDFR	100%	
					LSTNAYPDLR	100%	
					NNLELSTQLR	98%	
					VYFAGVPR	97%	
F1MTI7	Protein CutA	16.4 KDa	5.41	100%	SVHPYEVAEVIALPVEQGNSPYLQWVR	100%	27%
					TQSSLVPALTDFVR	100%	
A6QM01	N-acetyl-alpha-glucosaminidase	74.0 KDa	5.81	100%	DPVADLGAWVTSFAAR	99%	16%
					LLGPGPAAAFSVSVER	100%	
					LPQPLPAVPEELTEATPNR	98%	
					NAFQLEQTFVLGTR	99%	
					QLAGLVADYYAPR	99%	

					SDVFEAWR	99%	
					SLATESGLDTYR	100%	
					VQVLGSTGVAAAAGLHR	100%	
					YGVSHGDAEAAWR	100%	
Q3T010	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4	25.1 KDa	5.87	100%	HWLVSDIK	100%	
					IQGQELSPYHPPSPPAHSGLHR	99%	18%
					ITTWPEPIVK	97%	
F1MYX5	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	70.1 KDa	5.17	100%	ISFDEFIK	97%	
					LNLAFIANLFNK	100%	
					LSPEELLLR	99%	9,0%
					MINLSVPDTIDER	100%	
					NEALAALLR	100%	
P05307	Protein disulfide-isomerase	57.2 KDa	4.80	100%	ILEFFGLK	100%	
					LLDFIK	99%	10%
					THILLFLPK	100%	
					VDATEESDLAQQYGVR	100%	
F1MDF2	Beta-microseminoprotein	12.2 KDa	5.00	100%	DLSGVTHELK	100%	18%
					ETCTYTVLEK	100%	
Q5EA62	Fibulin-5	50.1 KDa	4.55	100%	DQPFTILYR	100%	
					SVPADIFQMQATTR	100%	8,0%
					YPGAYYIFQIK	96%	
Q2KIY5	Putative phospholipase B-like 2	65.6 KDa	8.46	100%	LALDGDSWADIFKR	96%	
					LTLQLK	99%	
					SLLDPETGQLR	98%	11%
					VLTVLEQIPGMVVADR	99%	
					YGPWFSDYDGSPR	100%	
					YWFQFR	99%	
G3MX66		21.3 Kda	4.36	100%	GQADLNAHVVESQSGR	100%	26%

Vitelline membrane outer layer 1 homolog					VEAPVTFGDNTAANNVR	100%	
F1MUB9	Serine protease 8	36.6 KDa	6.14	100%	GVAQVISHEK	100%	8,0%
					LGAHQLDYFSTDTQVR	100%	
Q3SYR8	Immunoglobulin J chain	17.8 KDa	5.07	100%	FVYHLSDLCK	100%	21%
					IIPSAEDPSQDIVER	100%	
					IIVPLNSR	100%	
Q9BGI2	Peroxiredoxin-4	30.7 KDa	6.01	100%	DYGVYLEDSGHTLR	100%	16%
					GLFIIDDK	98%	
					LVQAFQYTDK	100%	
					QITLNDLPVGR	100%	
P62992	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	17.9 KDa	9.68	100%	ESTLHLVLR	100%	20%
					MQIFVK	100%	
					TITLEVEPSDTIENVK	100%	
F1N0F2	Sialic acid acetyltransferase	59.6 KDa	8.50	100%	EPAGAVIWGYGTPR	96%	15%
					FASYIDDMVLQR	99%	
					FLYDTLR	98%	
					ILSVSSTQAQQELEDLAK	100%	
					LIFQGPLPQK	100%	
					NSPFGSIHPR	100%	
					WHQTADFGYVPNQR	98%	
F1MGU7	Fibrinogen gamma-B chain	50.2 KDa	5.44	100%	EGFGHLSPTGNTEFWLGNEK	98%	16%
					FLQEIYNSNSQK	100%	
					IHLISTQSTIPYVLR	100%	
					IQLEDWNGR	100%	
					LAIGEGQQHQLGGAK	97%	
					LDGSLDFKK	100%	
Q3ZCI9	T-complex protein 1 subunit theta	59.6 KDa	5.39	100%	AIADTGANVVVTGGR	100%	14%
					FAEAFEIPR	100%	

Q0VD19	Sphingomyelin phosphodiesterase	69.3 KDa	6.13	100%	LATNAAVTVLR	100%	8,0%
					LFVTNDAATILR	100%	
					ALTTITALVK	100%	
					GLFTAIDFGLR	98%	
					LATLCAQLSAR	100%	
Q9XSJ4	Alpha-enolase	47.3 KDa	6.37	100%	AAVPSGASTGIYEALRL	100%	15%
					DATNVGDEGGFAPNILENK	100%	
					GNPTVEVDLFTAK	100%	
					IGAEVYHNLK	100%	
					LAMQEFMILPVGAENFR	97%	
F1MZ40	Growth arrest specific 6	74.6 KDa	5.60	100%	VNQIGSVTESLQACK	100%	7,5%
					ALDLDEAAYK	96%	
					IAVAGDLFQLDR	100%	
					LELQLR	97%	
					LVAEFDFR	98%	
F1MNJ4	APC down-regulated 1	55.9 KDa	8.38	100%	TFDPEGILFFAGGHR	100%	8,0%
					TTWAVEAVAR	99%	
					AVNFAMHELQLVR	100%	
					AYQFYYGGNR	99%	
					HPTFTLYAR	100%	
L8IVU7	T-complex protein 1 subunit delta	58.6 KDa	7.52	100%	LVEELFLGDVHTDTAQR	99%	10%
					VLGGTEFVFK	100%	
					ALIAGGGAPEIELALR	100%	
					AYILNLVK	96%	
					DALSDLALHFLNK	100%	
					LVIEEAER	99%	
					MLVELSK	97%	
					VIDPATATSVDLR	100%	

Q32KV0	Phosphoglycerate mutase 2	28.6 KDa	8.99	100%	ALPFWNDEIAPQIK	99%	17%
					FLGDEETVR	97%	
					VLIAAHGNSLR	100%	
P31976	Ezrin	68.7 KDa	6.06	100%	APDFVIFYAPR	100%	5,0%
					IALLEEAR	100%	
					IGFPWSEIR	100%	
Q0V8R6	Beta-hexosaminidase subunit alpha	60.3 KDa	5.68	100%	EIYLV EPLAFEGSPEQK	100%	12%
					GLETFSQLIWR		
					GLLLDTSR		
					MVSNLDFAFK		
E1BI28	GM2 ganglioside activator	20.9 KDa	5.33	100%	TDIEDFPR	100%	25%
					EGAYSLPK		
					HIAGFWVK		
					LACVNISASLK		
					LQTILSNSAK		
					SDFMLPDLPLPSWLSTGNYR		
					TSAILSDPLK		
Q2KIM0	Tissue alpha-L-fucosidase	54.0 KDa	6.86	100%	TSAILSDPLKVELTVEK	100%	11%
					DLVGELGTAIR	100%	
Q29451	Lysosomal alpha-mannosidase	11.2 KDa	9.16	100%	FFNPDSWADLFKAAGAK	100%	5,0%
					DGSLELMVHR	98%	
					ETTLAANQLLAYASR	100%	
					LEHQFAVGEDSGR	100%	
					LIQLVNAQQR	100%	
					VAWHIDPFGHSR	100%	
Q95114	Lactadherin	47.3 KDa	6.81	100%	WGPETLLR	100%	15%
					DFGHIQYVAAYR	96%	
					INLFDTPLETQYVR	100%	

					QFQFIQVAGR	96%	
					VTGHITQGAR	100%	
					ATVLVYGSDDR	100%	
					GQLLLVWSDER	100%	
E1BDR2	Iduronidase, alpha-L-	71.5 KDa	8.65	100%	LDYIALHK	100%	9,0%
					LGMPVFPSAAQFR	100%	
					NLVSLAR	100%	
					YDLLR	100%	
					AILALTSTLNK	100%	
Q3MHX6	Protein OS-9	75.8 KDa	4.84	100%	ELEGILLPSDR	99%	5,0%
					LPAGAIHFQR	100%	
					FVPSYQAVEYMR	100%	13%
Q1RMN0	Aspartylglucosaminidase	27.1 KDa	8.65	100%	LSTFTQFPFMVYNPLK		
					DNIQGITKPAIR	100%	
P62803	Histone H4	11.3 KDa	11.36	100%	ISGLIYEETR	100%	29%
					VFLENVIR	100%	
					AVHSDQVAWQVR	100%	
					FIAVEQEYFR	100%	
G5E5M8	Alpha-mannosidase	115.1 KDa	6.50	100%	GLGSVVSVEER	100%	6,0%
					LMASIIQDR	96%	
					LWWDGVASDR	100%	
					LTTVAVDQVDAADGR	100%	
					SHPLMYQAIYPLQR	100%	
F1MGN0	Semaphorin 3F	89.0 Kda	8.50	100%	SIEAPQSPAVYAR	99%	9,0%
					TEQGLLLR	98%	
					VQLHVLGQEDIR	100%	
					YEVFLGTDR	99%	
Q9BGI1	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	23.2 Kda	8.28	100%	FSMVIEDGIVK	100%	20%

Q08E54	Amyloid beta (A4) protein	78.5 KDa	4.75	100%	LLADPSGTFGK	100%	9,0%
					THLPGFVEQADALK	98%	
					VNLAELFK	100%	
					EQNYSDDVLANIISEPR	100%	
					LALENYITALQAVPPRPR	97%	
P81425	Dipeptidyl peptidase 4	88.3 KDa	5.92	100%	THAHMVIPYR	99%	6,5%
					VESLEQEAAANER	100%	
					YLETPGDENEHAHFQK	98%	
					HSYTASYDIYDLNKR	100%	
					IQLNDYTK	100%	
F1MWT0	Mannosidase alpha class 2C member 1	115.8 KDa	5.97	100%	LGTFEVEDQIEATR	100%	9,2%
					RTYTLADYLK	97%	
					VTCLSCELNPDR	98%	
					YMGLPTPEDNLDYSYR	100%	
					AELAVFHR	98%	
F1N5H2	Alpha-L-fucosidase 2	53.6 KDa	6.40	100%	FEVWAHR	99%	10%
					GNVLSLSLLR	99%	
					ILHDVELLSSLALAR	100%	
					KPVLGQAGTLAVGTEGGVR	100%	
					LTSLVLVASGR	100%	
F1MU34	Aminopeptidase	107.0 KDa	5.78	100%	RDPTGPLLLR	100%	5,50%
					STQFLYPAALLQDLWR	100%	
					FFDANQWADILQASGAK	100%	
					IPAYVDFMK	99%	
					MLPELYELVNK	96%	
F1MU34	Aminopeptidase	107.0 KDa	5.78	100%	NAGIADYLTIEELVK	99%	5,50%
					QLPAWFDK	99%	
F1MU34	Aminopeptidase	107.0 KDa	5.78	100%	ASLINNAFQLVSIGK	99%	5,50%

					GFPLITITVR	99%	
					ILASTQFEPTAAR	97%	
					NPVGYPLAWQFLR	99%	
					TQEFPDILR	97%	
Q3ZBS7	Vitronectin	53.5 KDa	5.92	100%	DVWGIEGPIDAAFTR	100%	
					FQDGVLEPDFPR	99%	10%
					LLFWGGSYGGAGQPQLISR	100%	
E1BDY3	Golgi glycoprotein 1	134.6 KDa	6.46	100%	AKDDSELEGQVISCLK	99%	
					ALNEACESVIQTACK	99%	
					LDPVLYR	98%	
					LLELQYFISR	100%	5,0%
					VAELSSDDFHLDR	100%	
					VEELEMTEDIR	100%	
					VQSLPLLLGR	100%	
L8HKR7	Ig gamma-3 chain C region	33.2 KDa	7.98	100%	GLPAPIVR	100%	19%
					TTPPQLDADSSYFLYSK	100%	
Q9GLE5	72 kDa type IV collagenase	73.7 KDa	5.42	100%	AFQVWSDVTPLR	100%	5,0%
					WCGTTEDYDR	97%	
A5D984	Pyruvate kinase	57.9 KDa	7.96	100%	APIIAVTR	100%	
					LDIDSPPIAR	100%	5,50%
					VNLAMNVGK	99%	
G5E589	Proteasome subunit beta type	26.3 KDa	7.66	100%	AMTTGAIAAMLSTILYSR	99%	
					DVFISAAER	99%	15%
					LSEGFSIHTR	100%	
Q3SZB7	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	36.7 KDa	6.54	100%	DFDPALTEYVQR	100%	
					GSIYSLNEGYAK	97%	15%
					YVGSMVADVHR	100%	
Q4W1E4	Angiotensin-converting enzyme	82.6 KDa	6,55	100%	NYQDLAWAWK	99%	14%

Q32LQ0	Glutamyl aminopeptidase	109.8 KDa	5,14	100%	VNFLGLDLEEQQAR	100%	6,0%
					ASFIDDAFALAR	100%	
					ETNLLYDPDESASSNK	98%	
					GIPLTIYVQPEQK	98%	
					MLENWITR	97%	
					YLWLHLR	97%	
Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	49.8 KDa	4,79	100%	GHYTEGAELVDSVLDVVR	100%	11%
					INVYYNEATGGK	100%	
					ISEQFTAMFR	100%	
					LAVNMVPFPR	99%	
					LHFFMPGFAPLTSR	99%	
					YLTVAAVFR	98%	
Q863K8	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase	37.1 KDa	9,13	100%	GVSVWPVGLVGGLR	100%	10%
					ISQLQADLR	100%	
					LSQTLSLVPR	100%	
G3MZ03	Alpha 1,4-galactosyltransferase	41.6 KDa	9,18	100%	ALLAQLHAR	100%	10%
					DTPLAAWYAAVQR	100%	
					RWEPYLLPVLSASR	100%	
W5NTH3	Adhesion G protein-coupled receptor G6	139.4 KDa	8,37	100%	GNVVDWQNDFWNIPTLALK	100%	4,0%
					LLGSGNQHDIGSLK	99%	
					SGYFLSFFGSK	100%	
					VILPQSLDSYQVSVAK	99%	
Q08DW4	Mannan-binding lectin serine peptidase 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor)	81.2 KDa	5,02	100%	APEPINTQSHSIQILFR	100%	5,0%
					IEPLQTTYSEK	100%	
					TGVITSPDFSPYPK	100%	
					TLSDVLQYVK	100%	
Q148N3	Matrix metalloproteinase 7 (Matrilysin, uterine)	29.6 KDa	8,74	100%	IIIMEKPR	98%	13%
					IWSEAIPLTFK	100%	

					MEGFFHLPITGILSPR	100%	
L8IAH9	Sulfhydryl oxidase	73.0 KDa	9,03	100%	AEIPVGSGIK	100%	38%
					DTGAVLLAEFLAGR	100%	
					DAPSPVDAAFR	100%	
Q3SZV7	Hemopexin	52.2 KDa	9,03	100%	DYFMSCPNR	100%	9,4%
					LDLNLGAQATWTELPWLHTK	100%	
					NSVLLIK	100%	
Q3T0A3	Complement factor D	27.8 KDa	7,64	100%	AVLGPAVQLLPWQR	100%	17%
					LQHLLLPVLDR	100%	
Q2LGB2	Lymphocyte antigen 96	18.9 KDa	8,14	100%	FPVSIR	98%	13%
					GILYLYYIPR	100%	
A0A0A7NM57	Preprocathecidin antimicrobial peptide	16.5 KDa	6,31	100%	AVDQLNELSSEANLYR	100%	28%
					LLELDPPPDKDNEDLGTR		
F1MHS5	Protein S100-A9	17.0 KDa	6,29	100%	ELPNFLKK	99%	21%
					LGHYDTLIQK	99%	
					DICNDVLSLLEK	100%	
P63103	14-3-3 protein zeta/delta	27.7 KDa	4,73	100%	DSTLIMQLLR	99%	16%
					SVTEQGAELSNEER	100%	
					YLAEVAAGDDKK	100%	
					LYDFNSYWR	100%	
L8I064	Iduronate 2-sulfatase	57.9 KDa	5,41	100%	VPLMFYVPGR	100%	9,1%
					YSNFDVTTR	100%	
					LNSLLSIPEK	100%	
Q3SX46	C1GALT1-specific chaperone 1	36.4 KDa	6,23	100%	VDFFSSENVK	100%	13%
					VYCILLVRPK	97%	
					SLELGHGGLYACFHR	100%	
F1MLR4	Ciliary neurotrophic factor receptor	40.6 KDa	6,45	100%	EYIIQVAAK	99%	7,5%
					HSPQETPHVQYER	100%	

F1MLW8	Uncharacterized protein	24.6 KDa	5,58	100%	SDDTATLTIR	100%	15%
					VTVLGQPK	99%	
					YAASSYLSLTDSDWK	100%	
W5NXW9	Immunoglobulin heavy constant mu	49.8 KDa	5,44	100%	ALEHTYFER	99%	8,1%
					ESASVTCLVK	99%	
E1BNJ9	Serine protease 22	34.0 KDa	9,16	100%	IVGGEDSSDAEWPVVVSIR	100%	13%
					IVQGVQLR	100%	
					NRPGVYISLAAHR	100%	
Q32L48	Histone H2B type 1-N	13.9 KDa	10,31	100%	AMGNMNSFVNDIFER	100%	19%
					LLLPGELAK	100%	
Q3SYW2	Complement C2	82.9 KDa	8,67	100%	DFHINLFR	100%	5,1%
					DVTEVENSLR	100%	
					GESGGAVFLER	99%	
					HAIILLTDGK	100%	
					IIMSVLEDR	99%	
					DILSQLGIK	99%	
					ETQSHFLGK	100%	
					IFTSDADFSGITDDHK	100%	
P19120	Heat shock cognate 71 kDa protein	71.2 KDa	5,37	100%	LTPETLTR	98%	12%
					DAGTIAGLNVLR	100%	
					FEELNADLFR	100%	
W5Q3V3	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit E2	26.1 KDa	8,75	100%	TTPSYVAFTDTER	100%	8,0%
					LSRIVTDPK	100%	
Q1ZYR0	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5	41.2 KDa	8,04	100%	LLEPVVIVR	100%	5,0%
					LAELGADFK	100%	
P45478	Palmitoyl-protein thioesterase 1	34.1 KDa	6,31	100%	LQAPVWEFK	99%	17%
					ETIPLQESTLYTQDR	100%	
					KIPGIHVLSLEIGK	100%	

					LQQGYNAMGFSQGGQFLR	100%	
					LVQAEYWHUPIR	100%	
Q6T182	Sex hormone-binding globulin	40.0 KDa	5,43	100%	IALGGLLPASDLR	100%	11%
					VVLSSGSGPGLDLPLILGLR	100%	
F1MY12	Uncharacterized protein	24.4 KDa	9,04	100%	TSQQSQLLIAGYLR	100%	11%
					LGFQELYK		
Q17QR9	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (Testican) 1	49.4 KDa	5,34	100%	FDTSLPICK	99%	
					SLLGAFIPR	99%	9,0%
					LKDWFGALHEDANR	100%	
A2I7N1	Serpin A3-5	46.3 KDa	6,48	100%	GPTLTEILEGLK	100%	14%
					VLYSSEAFPTNFR	100%	
A6BMK7	Sialidase-1	45.4 KDa	6,40	100%	GTLLAFAEAR	100%	
					IPLITTPR	100%	9,0%
					LIVCGHGTLE	98%	
					NQYMESISLVK	95%	
P01045	Kininogen-2	68.9 KDa	6,09	100%	ATVQVVGGLK	100%	
					SPDLEPVLR	99%	4,5%
					SGNQFVLYR	99%	
Q3T052	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	101.4 KDa	6,22	100%	HLGAYELLLK	99%	
					LLLQNTDR	99%	3,5%
					LREQSPDVLLAQIR	99%	
					GFGGAMTDAAALNILALSPAAR	100%	
Q2KHZ8	Glucosylceramidase	59.8 KDa	8,06	100%	LLMLDDQR	96%	
					NFVDSPIIVDIAK	99%	11%
					SVSLFASPWTSPTWLK	98%	
					TGTGLLLTLQPDQK	99%	
Q863C3	Gastrin-releasing peptide	14.9 KDa	7,02	100%	EYAQWEEATR	100%	22%
					NLLSLLQAK	100%	

A0JN47	Plexin domain containing 2	59.4 KDa	6,14	100%	VGLSDAFVVVHR MLTATQYIAPLMANFDPSVSR	100% 99%	6,2%
E1B8A0	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	37.7 KDa	9,46	100%	FQETFEDVFSASPLR FVAVGDWGGVPNAPFYTAR EMSVTYIEASGK	100% 100% 100%	14%
O46375	Transthyretin	15.7 KDa	5,9	100%	AADETWEPFASGK SLGISPFHEFAEVVFTANDSGPR	100% 100%	24%
A7MBJ5	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	136.3 KDa	5,52	100%	ISGSILNELIGLVR AVAALLTIPEAEK	100% 99%	4,0%
F1MHR8	Matrilin 2	106.9 KDa	6,55	100%	VGLLQYSTLVR VAIVFTDGR	100% 99%	4,0%
F1N554	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	63.4 KDa	8,3	100%	GAFDWEMYYK KPLEDYMALFPSVR	98% 99%	6,0%
P00517	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	40.6 KDa	8,71	100%	ILQAVNFPFLVK NLLQVDLTK	100% 100%	6,2%
P68103	Elongation factor 1-alpha 1	50.1 KDa	9,1	100%	KIGGIGTVPVGRV KQLIVGVNKM	100% 100%	7,0%
P80025	Lactoperoxidase	80.6 KDa	8,83	100%	VGPLLACLLGR IHGFDLAAINLQR ISNVFTFAFR VPCFLAGDFR	100% 98% 100% 95%	4,4%
P52193	Calreticulin	48.0 KDa	4,31	100%	VHVIFNYK FYALSAR	99% 97%	5,3%
L8J2B5	Amyloid-like protein 2	86.7 KDa	4,69	100%	SHIVIPFK ADMDQFSSSFSETPVDVR	100% 99%	6,0%
F1MD95	Calsynenin 1	106.4 KDa	4,73	100%	AASEFESSEGVFLFPELR GNLAGLTIR	100% 100%	4,0%
Q3T149	Heat shock protein beta-1	22.3 KDa	5,98	100%	LFDQAFGLPR	100%	21%

					SATQSAEITIPVTFQAR	97%	
					VSLDVNHFAPEELTVK	99%	
Q2KIF2	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	38.3 KDa	6,50	100%	FLLPVPQLK	99%	
					LASVAAGAFR	100%	12%
					LQVLGEGLLAPQPK	100%	
W5P1A8	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	125.0 KDa	6,35	100%	RLPSAYSFSVSRR	100%	
					RVFDADVVPASGELLRR	100%	3,2%
					LLGGESLPFR	100%	
Q3ZBH0	T-complex protein 1 subunit beta	57.4 KDa	6,18	100%	GATQQILDEAER	100%	
					LAVEAVLR	100%	4,0%
F1N303	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 19	133.7 KDa	8,26	100%	DLYLLLR	100%	
					SLGVQVNLR	99%	1,3%
P0C0S9	Histone H2A type 1	14.0 KDa	10,9	100%	AGLQFPVGR	100%	
					HLQLAIR	99%	12%
B9TUD2	Cathelicidin 7	18.8 KDa	9,23	100%	LLELDPPPEEDVEHPGAR	100%	
					KPVSFTVK	99%	16%
P10096	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35.8 KDa	8,51	100%	LISWYDNEFGYSNR	100%	
					VPTPNVSVVDLTCR	99%	8,4%
					AITIFQR	97%	
					LTGMAFR	99%	
Q5E9I4	MGAT1 protein	51.7 KDa	8,82	100%	VYGAPLLQVEK	99%	
					GIVSFLYR	100%	7,0%
					LAQDAEVELER	98%	
P02584	Profilin-1	15.0 KDa	8,46	100%	TLVLLMGK	98%	
					TFVNITPAEVGILVGK	99%	17%
A6QP36	LMAN2 protein	40.4 KDa	7,21	100%	LVPGPVFGSK	99%	
					NLHGDGIALWYTR	99%	6,4%
Q95121	Pigment epithelium-derived factor	46.2 KDa	6,57	100%	LAAAVSNFGYDLYR	99%	9,0%

					DLLASVTAPQK	99%	
E1BKZ9	Sortilin	91.8 KDa	5,69	100%	EPIYFTGLASEPGAR	100%	5,0%
					ADLGALELR	100%	
A6QNL5	PDIA6 protein	49.6 KDa	5,11	100%	TGEAIVDAALSALR	100%	6,40%
					LAAVDATVNQVLASR	100%	
Q3ZBM0	A proliferation-inducing ligand	27.6 KDa	9,40	100%	GLEAQGYVVR	100%	10%
					LSLSPHGTFLGLVK	99%	
Q5E9B1	L-lactate dehydrogenase B chain	36.7 KDa	6,02	100%	LIAPVAEEETR	100%	9,0%
					FIIPQIVK	100%	
Q2NKZ9	Carboxypeptidase	50.8 KDa	5,6	100%	IPFYIFSESYGGK	99%	8,3%
					VVSNLEFTQK	99%	
A6QLS9	RAB10 protein	22.5 KDa	8,58	100%	LLLIGDSGVGK	100%	11%
					LQIWDTAGQER	99%	
E1BKX1	Cell migration inducing hyaluronan binding protein	152.7 KDa	7,62	100%	IFQVVPIPVVR	100%	3,5%
					LAQYLNAVDPGR	100%	
A6QPT4	MPO protein	81.8 KDa	9,9	100%	RVPALNLAPWRE	100%	8,0%
					RVVLEGGIDPILRG	100%	
					ALLPFDTLR	99%	
Q3T0K2	T-complex protein 1 subunit gamma	60.5 KDa	6,38	100%	TAVETAVLLLR	99%	6,0%
					IVLLDSSLEYK	99%	
Q3B7N2	Alpha-actinin-1	102.9 KDa	5,25	100%	LASDLLEWIR	100%	2,5%
					VGWEQLLTIIAR	99%	
Q3MHN5	Vitamin D-binding protein	53.3 KDa	5,36	100%	VLDQYIFELSR	99%	7,0%
					VPTAHLEDVLP LAEDITTILSK	99%	
G3N2D8	Uncharacterized protein	60.9 KDa	5,94	100%	LFQPSIELAR	100%	3,7%
					GIDQAVVAALK	100%	
P07456	Insulin-like growth factor II	19.6 KDa	9,11	100%	SCDLALLETYCATPAK	100%	14%
					GIVEECCFR	99%	

P62935	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	17.8 KDa	8,34	100%	VSELFADK VNPTVFFDIAVDGEPLGR FDDENFILK	100% 99% 97%	16%
P14769	N-acetyllactosaminide alpha-1,3-galactosyltransferase	42.2 KDa	5,98	100%	APVVWEGTYNR LSDWFNPFK	100% 100%	8,2%
Q0VCQ9	Reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	36.9 KDa	4,28	100%	EALLGGQEEVDEYVK VIDFVENTALDDAEESFR	100% 100%	11%
F1N5W4	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5	41.7 KDa	5,68	100%	IQPILAVADDGWHILR HIEWFTSK VLLVSFDGFR	100% 100% 97%	9,1%
F1MZJ5	ADAM metalloproteinase domain 9	88.1 KDa	6,85	100%	EAPRPFSEQVSYVIQAEKG EHIIHLER	99% 97%	4,5%
F1MWD3	Chaperonin containing TCP1 subunit 5	59.5 KDa	5,62	100%	ISDSVLVDMK LGFAGLVK	100% 100%	3,3%
Q17QK3	Carboxypeptidase Q	51.6 KDa	5,55	100%	VGALASLIR LALLVDTVGPR	100% 100%	6,0%
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein	38.4 KDa	5,26	100%	QDQQFSVLFTK HTLNQIDSVK	100% 99%	7,2%
G3X6G7	Meteorin like, glial cell differentiation regulator	33.8 KDa	8,83	100%	VFRPAPEGEGGGWR TTGFQYELTSR	100% 99%	8,1%
P81947	Tubulin alpha-1B chain	50.1 KDa	4,94	100%	LISQIVSSITASLR EIIDLVLDR NLDIERPTYTNLNR	100% 100% 97%	5,1%
A1L570	Ephrin-B1	38.0 KDa	9,10	100%	IGDKLDIICPR GLVIYPK	100% 98%	7,2%
A6QLZ3	ARSB protein	59.3 KDa	6,79	100%	GVGVFVASPLLK LLPQLLK	100% 97%	5,0%
E1B9P4	Epididymal sperm binding protein 1	26.0 KDa	8,27	100%	WSLCADTR	99%	7,2%

					CVFPFIYR	99%	
L8IHR1	Protocadherin Fat 2	479.3 KDa	5,06	100%	IDPYLGDISLR	98%	1,0%
					LLVDSASSTSLK	98%	
E1BBU4	ADAM metallopeptidase domain 15	93.2 KDa	6,58	100%	IQDLLLP	100%	2,0%
					GLVILSPER	99%	
Q2T9S4	Glycerol-3-phosphate phosphatase	34.3 KDa	5,18	100%	GETAVPGAPETLTALR	99%	9,0%
					TILTLTGVSSLR	100%	
P13696	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	20.9 KDa	6,96	100%	LYTLVLTDPDAPSR	100%	
					NRPTSITWDGLDPGK	100%	26%
					GNNISSGTVLSDYVVGSGPPK	100%	
A8DC37	Fc-gamma-RII-D	31.3 KDa	8,99	100%	AVVSIQPAWINVLR	99%	8,0%
					TNFSIPR	100%	
Q5E946	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	20.0 KDa	6,84	100%	KIVEVLVGKE	97%	12%
					KGAEEMETVIPVDVMRR	98%	
D4QBC5	Hemoglobin beta	15.9 KDa	6,36	100%	AAVTAFWSK	100%	
					VHVDEVGGEALGR	100%	50%
					NFGNEFTPVLQADFQK	100%	
A6QLR7	ARSG protein	56.6 KDa	8,22	100%	VAAALAGVLADIAR	99%	5,0%
					VPALAYWPGR	99%	
P08037	Beta-1,4-galactosyltransferase 1	44.8 KDa	9,38	100%	VAIIPFR	100%	4,0%
					LLNVGFK	100%	
Q5W5U3	Hexokinase 1	102.2 KDa	6,29	100%	LVDEFSLNSGK	97%	3,0%
					SANLVAATLGAILSR	100%	
Q32L40	T-complex protein 1 subunit alpha	60.2 KDa	5,8	100%	EQLAIAEFAR	96%	
					TSASVILR	100%	5,2%
					FATEAAITILR	97%	
L8I2G8	Uncharacterized protein	33.9 KDa	8,4	100%	DASLGQVI	99%	11%
					LNNWISSGNMK	99%	

					LSMVIIIPSK	100%	
F1N7F3	Receptor protein-tyrosine kinase	131.6 KDa	6,75	100%	IPLNLQIIR	100%	2,0%
					NLQEILQGAVR	100%	
Q7YRE5	Protein O-fucosyltransferase 2b	52.8 KDa	5,82	100%	LGSSLGGPYLGVHLR	97%	6,3%
					IPWSDFFDLPSLNR	100%	
Q2NL29	Inositol-3-phosphate synthase 1	60.7 KDa	5,68	100%	APLAPPGSPVVNALFR	100%	5,2%
					SVLVDFLIGSGLK	100%	
A4IFR2	PCSK1N protein	27.2 KDa	7,99	100%	ILTGIADTEAVAAPR	100%	14%
					LDPAALAAQLVPAPAPAAALR		