

DENISE SILVA OKANO

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM TOUROS: PROTEÔMICA DO PLASMA
SEMINAL E TESTE DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

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

Orientador: José Domingos Guimarães
Coorientador: Eduardo Paulino da Costa

**VIÇOSA- MINAS GERAIS
2019**

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

T

O41p
2019
Okano, Denise Silva, 1988-
Parâmetros reprodutivos em touros : proteômica do plasma
seminal e teste de congelabilidade do sêmen / Denise Silva
Okano. – Viçosa, MG, 2019.
81f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Andrologia. 2. Cruzamento. 3. Sêmen. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.2

DENISE SILVA OKANO

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM TOUROS: ANÁLISE PROTEÔMICA DO
PLASMA SEMINAL E TESTE DE CONGELABILIDADE DO SEMÊN**

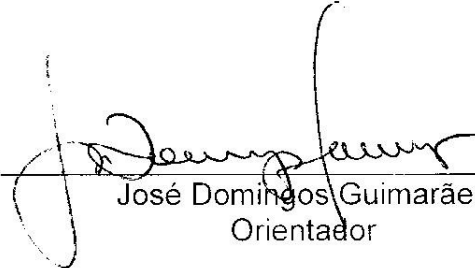
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2019.

Assentimento:



Denise Silva Okano
Autora



José Domingos Guimarães
Orientador

RESUMO

OKANO, Denise Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Parâmetros reprodutivos em touros: proteômica do plasma seminal.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientador: Eduardo Paulino da Costa

Na espécie bovina existem animais que acumulam espermatozoides senescentes na cauda do epidídimo, devido a abstinência sexual, esses animais caracterizam-se por ejacularem grande volume de sêmen com baixa motilidade espermática e que com coletas consecutivas tem o aumento gradual dessa característica. Essa condição se apresenta principalmente em touros criados sob manejo extensivo, e o uso desses animais pode diminuir a eficiência reprodutiva durante a estação de monta (BARTH 2007). O plasma seminal é uma mistura bioquimicamente complexa e que tem importância significativa na regulação da função espermática. Diante disso, o objetivo desse estudo foi identificar o perfil proteômico em ejaculados de touros aprovados e em repouso sexual imediatamente após a avaliação do primeiro ejaculado. Foram utilizados seis touros em repouso sexual, e dois animais como controle. Três grupos foram formados, sendo o grupo A constituído por amostras do sêmen da primeira coleta dos touros em repouso sexual; grupo B: amostra de sêmen da última coleta dos touros em repouso sexual; e grupo C: amostra de sêmen dos touros controle. Todos os touros foram submetidos à avaliação andrológica 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 estudo proteômico. Depois da centrifugação, as proteínas do plasma seminal foram quantificadas pelo método de Bradford e analisadas por meio de eletroforese monodimensional e espectrometria de massas (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 STRAP 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. Os dados referentes à motilidade espermática foram submetidos à transformação angular ($Y' = \arcsen\sqrt{Y}$). As variáveis quantitativas foram analisadas por ANOVA. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi $\alpha = 5\%$. Foram encontrados 1,67% de touros em repouso sexual (7/419). Houve diferença ($p < 0,05$) em relação à motilidade, vigor e turbilhamento

espermático entre os grupos, porém não houve diferença das características morfológicas. Na análise proteômica foram identificadas 93 proteínas no plasma seminal. A maioria delas envolvidas no processo celular (36,22%), regulação biológica (35,20%) e interação celular (19,12%). Das proteínas identificadas 6 foram diferencialmente expressas entre o grupo A e B (ALBU, NPC2, Z13, SPAD1, CCL2, F1N1Z8), e 4 (Q4R0H2, SPAD1, NPC2 e Z13) foram diferencialmente expressas entre B e C. Em relação às funções moleculares das proteínas, as principais funções foram de ligação (49,50 %) e atividade catalítica (35,34%).

Palavra-chave: Andrologia. Cruzamento. Sêmen

ABSTRACT

OKANO, Denise Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Reproductive parameters in bulls: seminal plasma proteomics** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-Adviser: Eduardo Paulino da Costa

In bovine species there are animals that accumulate senescent sperm in the tail of the epididymis, due to sexual abstinence, these animals are characterized by ejaculating large volume of semen with low sperm motility and that with consecutive collections has the gradual increase of this characteristic. This condition occurs mainly in bulls reared under extensive management, and the use of these animals may decrease reproductive efficiency during the breeding season. Seminal plasma is a biochemically complex mixture that is of significant importance in regulating sperm function. Therefore, the objective of this study was to identify the proteomic profile in ejaculates of approved bulls and in sexual rest immediately after the evaluation of the first ejaculate. Six bulls were used in sexual rest, and two animals as control. Three groups were formed, and group A consisted of semen samples from the first collection of the resting bulls; group B: semen sample from the last collection of bulls at sexual rest; and group C: semen sample from control bulls. All bulls were submitted to andrological evaluation by the electroejaculation method and the physical and morphological aspects of the ejaculate were evaluated by conventional optical microscopy and phase contrast. After the analyzes, the ejaculates were centrifuged and the supernatants (seminal plasma) were used for proteomic study. After centrifugation, seminal plasma proteins were quantified by the Bradford method and analyzed by one-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (LC-MS / MS). The proteins were identified by MASCOT and statistically validated using SCAFFOLD Q + software. Proteins were characterized according to their classes and biological processes by STRAP using the gene ontology terms deposited in the UniprotKB database. Differentially abundant proteins were quantified by the emPAI method considering only those proteins with foldchange greater than 1.5 times. The sperm motility data were submitted to angular transformation ($Y \wedge ' = \arcsen\sqrt{Y}$). Quantitative variables were analyzed by ANOVA. Qualitative variables were analyzed by the Kruskal-Wallis test. The significance level adopted was $\alpha = 5\%$. A total of 1.67% (7/419) of sexually resting bulls were found. There was a difference ($p < 0.05$) in relation to motility, vigor and sperm swirling between the groups, but there was no difference in morphological characteristics. In proteomic analysis 93 proteins were identified in seminal plasma. Most of them involved in the cellular process (36.22%), biological

regulation (35.20%) and cellular interaction (19.12%). Of the identified proteins 6 were differentially expressed between group A and B (ALBU, NPC2, Z13, SPAD1, CCL2, F1N1Z8), and 4 (Q4R0H2, SPAD1, NPC2 and Z13) were differentially expressed between B and C. The main molecular functions of proteins were binding (49.50%) and catalytic activity (35.34%).

Keywords: Andrology. Crossbred. Semen

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
CAPÍTULO 1. Análise proteômica do plasma seminal de touros Nelore acumuladores de sêmen (repouso sexual)	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Aspectos éticos	12
2.2. Local do experimento e animais.....	12
2.3. Avaliação andrológica.....	13
2.4. Extração e quantificação de proteínas.....	14
2.5. Processamento das proteínas do plasma seminal.....	15
2.5.1. Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE)	15
2.5.2. <i>Short-run</i>	15
2.6. Digestão de proteínas em gel.....	16
2.7. Espectrometria de massas LC-MS/MS.....	17
2.8. Identificação das proteínas.....	17
2.9. Classificação funcional das proteínas.....	18
2.10. Análise quantitativa das proteínas identificadas.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4. CONCLUSÃO.....	29
5. REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2. Parâmetros reprodutivos e congelabilidade do sêmen de touros 3/4 e 5/8 Holandês x Gir da raça Girolando.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODO.....	42
2.1 Local, animais e manejo.....	42
2.2 Mensurações biométricas dos órgãos genitais.....	42
2.3 Coleta e avaliações dos ejaculados.....	43
2.4 Congelamento de sêmen e análise do sêmen pós-descongelamento.....	43
2.5 Avaliação ultrassonográficas.....	44
2.6 Análises estatísticas.....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4. CONCLUSÃO.....	55

7. REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO 1.....	59
ANEXO 2.....	81

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil ocupa o segundo lugar no mundo em produção de carne e em tamanho de rebanho bovino, sendo 15,3% da produção mundial e 13% do rebanho mundial (216,1 milhões de cabeças) e o uso da inseminação artificial (IA) se restringe a apenas 14% (ASBIA, 2018). Sendo assim, no Brasil, assim como ocorre em outros países, a maioria do rebanho bovino é oriundo de animais em regime de monta natural, portanto a importância do exame andrológico em touros se insere tanto na questão econômica quanto na questão do avanço genético do rebanho bovino. Isso porque os machos acasalam com um número maior de fêmeas, e, portanto, contribuem em maior proporção com as mudanças genéticas dentro do rebanho. Dessa forma a escolha do macho gera maior impacto econômico e genético na pecuária, fica claro então, a importância do exame andrológico na busca por melhoria contínua desses dois aspectos dentro da cadeia produtiva da carne. (CHENOWETH, 2016).

No exame andrológico, as características mais correlacionadas com a fertilidade, são o perímetro escrotal, a motilidade e a morfologia espermática (BRINKS, 1994; PARKINSON, 2004). Porém, outros fatores podem influenciar a fertilidade dos touros como o manejo e/ou ambiente, fatores intrínsecos dos espermatozoides como integridade de membranas e de DNA, função mitocondrial, proteínas e metabolitos, que são modulados pelo meio em que são mantidos, o plasma seminal (FLOWERS, 2013; VIANA, 2018).

Os animais mestiços contribuem em cerca de 70% na produção de leite nacional, porém vários estudos têm demonstrado grande variabilidade dos parâmetros reprodutivos nos animais cruzados. Contudo, há algumas décadas, com a implantação de plataforma de ação de difusão da raça, a Associação Brasileira de Criadores de Girolando em parceria com a Embrapa Gado de leite tem focado na seleção de machos para difundir a raça. Para isso, os touros precisam passar por vários critérios de seleção tais como avaliações genômicas, andrológica, comportamental, genealógica e de produção. Após essa filtragem os animais são submetidos ao teste de congelabilidade quando então são enviados para centrais de inseminação comercial, para produção e distribuição de sêmen para o rebanho nacional, ou então comercializados para uso e em manejo de monta natural. Apesar dessas avaliações até o momento, não há um modelo ideal de seleção para predizer com grande acurácia o potencial reprodutivo de touros doadores de sêmen. Em virtude das características relacionadas à reprodução avaliadas no sequenciamento genômico não abrangerem os parâmetros reprodutivos em bovinos.

Os componentes do plasma seminal, exercem funções fundamentais para capacidade fertilizante do espermatozoide, como controle osmótico e de pH, transporte de íons, lipídios e hormônios (KASIMANICKAM, 2019). Dentre esses componentes as proteínas do plasma

seminal se destacam pois tem capacidade de interagir com diferentes moléculas respondendo às alterações do ambiente, controlando mecanismos como capacitação e interação com secreções do trato reprodutivo feminino (ROBERTSON, 2005).

E, portanto, o plasma seminal tem sido objeto de estudo no âmbito da reprodução humana e animal para entendimento da fisiologia a nível molecular. Com isso, a partir do estudo proteômico do plasma seminal muitas pesquisas têm sido realizadas associando plasma seminal e fertilidade nas diversas espécies, com o intuito de identificar possíveis marcadores moleculares para fertilidade. (DRUART et al., 2019)

Diante do exposto o objetivo desse estudo foi identificar o perfil proteômico em ejaculados de touros aprovados ou em repouso sexual imediatamente após a avaliação do primeiro ejaculado. E avaliar os parâmetros reprodutivos e a congelabilidade do sêmen de touros 3/4 e 5/8 Holandês x Gir (Girolando).

CAPÍTULO 1

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS NELORE ACUMULADORES DE SÊMEN (REPOUSO SEXUAL)

1. INTRODUÇÃO

Durante a ejaculação, os espermatozoides são misturados ao plasma seminal (PS), aumentando o volume do ejaculado e assim facilitam o transporte no trato genital da fêmea. (MOURA et al., 2006). Portanto, no passado a função do PS era limitada à nutrição e transporte de espermatozoides para o trato reprodutivo da fêmea e ainda hoje os aspectos bioquímicos e fisiológicos do plasma seminal são pouco compreendidos. Porém, com a nova era de tecnologias moleculares novas linhas de pesquisa surgiram na andrologia.

A proteômica é uma área da biologia molecular para ajudar a identificar e entender a função das proteínas, com o potencial de que a identificação das diferencialmente expressas possam servir como biomarcadores para fertilidade masculina (SELVAM et al., 2018). Segundo Baker et al. (2012) a transcrição e a tradução nos espermatozoides são inativas, portanto, eles dependem de suas próprias proteínas para exercerem suas funções biológicas.

A maioria das proteínas do PS estão envolvidas nas vias de sinalização celular (SELVAM et al., 2018) e tem importante função na maturação final dos espermatozoides, fornecem energia para o metabolismo, estimulam a motilidade, regulam e controlam a capacitação espermática, protegem contra o sistema imune feminino e estresse oxidativo e atuam mediando a interação espermatozoide-ovócito (MANJUNATH et al., 2008; MOURA et al., 2010; ALBERTS et al., 2014; da SILVA et al., 2016).

Entretanto, enquanto algumas proteínas presentes no plasma parecem ser benéficas para as funções dos espermatozoides, outras proteínas parecem ser prejudiciais nos processos de preservação espermática, como a criopreservação (MANJUNATH, 2007)

Durante o trânsito epididímario, o principal local de armazenamento de espermatozoides dentro do trato reprodutivo masculino é a porção caudal do epidídimo. A cauda do epidídimo contém 70% do número total de espermatozoides (AMANN, 1981). Embora o ambiente seja favorável à sua sobrevivência, os espermatozoides não são preservados indefinidamente.

A maioria dos espermatozoides não ejaculados é gradualmente eliminada por excreção para urina. Aqueles não eliminados na urina sofrem uma gradual senescência. Primeiro eles perdem a capacidade de fertilização, depois a sua motilidade e finalmente desintegram-se. Ejaculados obtidos após um prolongado descanso sexual usualmente contém uma alta porcentagem de espermatozoides em degeneração ou “velhos” (HAFEZ, 1995).

Na espécie bovina existem animais que acumulam espermatozoides senescentes na cauda do epidídimo. Essa condição se apresenta principalmente em touros criados sob manejo extensivo, e o uso desses animais pode diminuir a eficiência reprodutiva durante a estação de monta (BARTH, 2007). A causa do acúmulo de espermatozoides em touros é desconhecida. Barth e Oko (1989), sugerem que exista alguma anormalidade no mecanismo de transporte que resulta na retenção dos espermatozoides nas ampolas e cauda do epidídimo. Essa condição pode afetar as taxas de gestação no período inicial da estação reprodutiva, e parece ser condição permanente (BARTH, 2007). Dessa forma é fundamental a identificação dessas proteínas para o entender os mecanismos que modulam a função espermática durante o armazenamento no epidídimo e seu efeito sobre o ejaculado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspecto ético

Todos os animais utilizados neste estudo foram conduzidos em estrita conformidade com as normas de conduta para 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 número 712/2017.

2.2 Local do experimento e animais

Este estudo foi realizado na Fazenda Lageado, de propriedade da Agro-Pecuária CFM Ltda, CNPJ 51837284/0023-11, localizada no município de Dois Irmãos do Buriti, situado região centro-oeste do Mato Grosso do Sul, latitude: 20° 38' 68" S, longitude: 55° 44' 15"

O repouso sexual foi definido como animais que ao primeiro estímulo para coleta de sêmen, ejacularam grande volume de sêmen com baixa motilidade e que com coletas consecutivas a motilidade aumentou gradualmente atingindo os valores mínimos aceitos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os animais escolhidos como controle foram aqueles que tiveram excelentes parâmetros físicos do sêmen em uma única coleta.

As amostras foram colhidas em setembro de 2018, durante o exame andrológico dos touros que fazem parte do rebanho base da fazenda e entraram em serviço durante a estação de monta 2018/2019. Durante o exame em 419 touros, foram identificados 7 animais em repouso sexual (1,67%), e um animal foi descartado do estudo por apresentar amostras contaminadas. Foram então, utilizados 8 touros adultos da raça Nelore, sendo seis usados como tratamento e dois como controle com idades variando entre quatro e oito anos de idade. Os animais eram

criados em regime extensivo, a pasto predominantemente de capim *Urochloa brizantha* e colônia (*Panicum maximum*), com sal mineral e água *ad libitum*.

As avaliações físicas do sêmen foram feitas a campo, logo após a coleta. A avaliação morfológica do sêmen foi realizada posteriormente no laboratório de Andrologia Animal do Departamento de Veterinária-UFV, e as análises proteômicas realizadas no Núcleo de Análise de Biomoléculas- UFV e no Instituto de Química da USP.

2.3 Avaliação andrológica

Para avaliação os animais foram contidos individualmente em tronco apropriado e então realizado o exame andrológico seguindo os padrões do CBRA. O exame constituiu na inspeção e palpação do prepúcio, pênis, testículos, epidídimos, e cordão espermático observando-se tamanho posição, simetria e consistência de cada órgão. Em seguida as mensurações de perímetro escrotal foram obtidas com auxílio de uma fita métrica na região mais larga do escroto, e com auxílio de um paquímetro mensurou-se a largura e comprimento (excluindo-se a cauda do epidídimo) testicular. Posteriormente, as vesículas seminais foram avaliadas por meio de palpação retal quanto à sensação dolorosa, tamanho (comprimento e largura) e consistência.

A colheita de sêmen foi feita utilizando-se o eletroejaculador e realizada a avaliação das características físicas do sêmen como turbilhonamento, motilidade e vigor sob microscopia óptica convencional em aumento de 100 x. O turbilhonamento foi avaliado em uma gota de sêmen sobre lâmina pré-aquecida à 37 °C, numa escala de 0 a 5, e a motilidade (0 a 100%) e vigor (0 a 5), em uma alíquota de sêmen (10 µl) colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas à 37 °C.

Nos animais em repouso sexual, a cada estímulo, era colhida uma amostra de sêmen em tubo graduado (15 ml) identificado, e realizada a avaliação de turbilhonamento, motilidade e vigor. E este procedimento foi repetido até que a motilidade espermática atingisse valor maior ou igual à 60%, não excedendo mais do que 5 coletas por animal.

Foram utilizadas duas amostras do sêmen dos animais em repouso sexual e uma amostra dos animais controle, para formar os seguintes grupos:

Grupo A: amostra de sêmen da primeira coleta dos touros em repouso sexual;

Grupo B: amostra de sêmen da última coleta dos touros em repouso sexual;

Grupo C: amostra de sêmen dos touros controle.

Para análise morfológica dos espermatozoides, uma alíquota de cada amostra foi armazenada em microtubos contendo 1 mL formol salina tamponada (HANCOCK, 1957). As patologias foram avaliadas em preparação úmida, em aumento de 1000x sob imersão, e avaliada por microscopia de contraste de fase. Para cada preparação, foram contabilizadas 200 células, e se determinou a percentagem de espermatozoides com defeitos de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda. Posteriormente, as patologias foram classificadas em defeitos maiores, menores e totais de acordo de acordo com Blom (1973), tal como preconizado pelo CBRA (1998).

Após a avaliação física do sêmen, as amostras devidamente identificadas foram imediatamente centrifugadas (700 g x 10 min). Posteriormente o sobrenadante (plasma seminal) foi transferido para um novo tubo graduado, com o qual repetiu-se o procedimento. Em seguida o plasma seminal foi envasado em palhetas de 0,5 mL e armazenadas em nitrogênio líquido (-196° C) até o momento da análise proteômica.

2.4 Extração e quantificação de proteínas

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, filtradas em membrana com malha de 0,22 µm (MAGALHÃES et al., 2016) e colocadas em microtubos (1,5 mL). Para precipitação das proteínas do plasma seminal, 100 µL de amostra foi adicionada a 600 µL de solução em acetona gelada (50%, v/v), ácido ticloroacético (10%, p/v) e 1mM de ditioneína (DTT), ressuspendidos em 250 µL de solução de solubilização (40mM de DTT, 4% CHAPS (3-3-cholamidopropyltrimethylammonio-1-propanesulfonate), 7 M Ureia, 2 M Tiureia).

A quantificação de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando-se solução padrão com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) para fazer a curva analítica de calibração. As alíquotas de BSA foram homogeneizadas em 150µL do reagente de Bradford 1X, adicionando-se posteriormente água milli-Q até completar um volume final de 200 µL.

A solução foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e foram realizadas as leituras das triplicatas em espectrofotômetro com comprimento de onda de absorvância de 595 nm. Anteriormente à leitura das concentrações de BSA previamente conhecidas, foi feita leitura da placa vazia. E o resultado foi obtido subtraindo as médias da leitura do BSA das médias da leitura da placa vazia, obtendo-se uma equação linear ajustada em função da concentração. E então, para quantificar as proteínas do plasma seminal, o mesmo procedimento foi realizado, sendo o resultado baseado na equação obtida.

2.5 Processamento das proteínas do plasma seminal

As proteínas do plasma seminal foram processadas por meio de duas abordagens eletroforéticas de separação.

2.5.1 Eletroforese Monodimensional (SDS- PAGE)

Os géis de resolução foram preparados a 14% da relação acrilamida/bisacrilamida e corridos a 70 volts por 4 horas, no sistema de eletroforese no sistema de eletroforese MiniProtean (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 posteriormente descorados por 10 horas (LAEMMLI, 1970).

2.5.2 Short-Run

Consiste na migração das proteínas por aproximadamente um centímetro no gel de separação e alcançando esta marca a corrida é interrompida (LIEBLER e HAM, 2009; RESJÖ et al., 2017). Essa metodologia visa reduzir o número de interferentes e perdas de proteínas, sem a efetiva separação das mesmas.

As amostras foram agrupadas em “pools”, sendo um pool da primeira coleta de sêmen dos animais em repouso sexual, ou seja, do sêmen com baixa motilidade, um segundo pool da última coleta desses mesmos animais, consistindo no plasma seminal do sêmen que teve motilidade maior do que 60% e um terceiro pool dos animais controle.

Os pools foram formados com 60 µg de proteínas de cada animal, em quadruplicata, e em seguida submetidos à migração em gel SDS-Glicina-PAGE 14%, assim como o marcador molecular. A corrida foi interrompida ao se atingir aproximadamente um centímetro no gel de separação.

Após a corrida, os géis foram colocados em solução fixadora (metanol 40%, ácido acético 5%) por duas horas. O gel foi cortado e a parte do marcador molecular foi corada em solução de Coomassie Brilliant Blue-R-250 (Bio-Rad®) por 15 horas, e a outra parte foi armazenada em ácido acético 5%. Os géis foram digitalizados no equipamento ImageScanner III (GE Healthcare®, EUA) e salvos em formato .TIF (RESJO et al., 2017)

2.6 Digestão de proteínas em gel

As bandas de proteínas dos géis foram excisadas individualmente, cortadas em pedaços menores e transferidas para microtubos novos e descoradas por três lavagens em 200 µL de 50% (v/v) acetronitrila (ACN) e 25mM de bicarbonato de amônio (pH 8.0). Em seguida, a desidratação dos géis foi feita incubando-os por duas vezes em 200 µl de ACN 100% por 5 minutos e secos em sistema de concentração à vácuo (AG22331, Eppendorf®, Alemanha).

A redução das proteínas presentes nos fragmentos dos géis foi feita em 100 µL de DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, à 56 °C por 30 minutos. Em seguida a alquilação foi feita com 100 µL de iodoacetamida 200mM e bicarbonato de amônio 100 mM à 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 minutos em gelo, foram adicionados 50 e 100 µL da solução de ativação aos tubos contendo os fragmentos dos géis provenientes da eletroforese *short-run*.

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 minutos 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 e a solução foi transferida para 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 trípticos 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 %.

2.7 Espectrometria de massa 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, 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 Daemon para o confronto com o banco de dados.

2.8 Identificação das proteínas

As listas de massas geradas foram confrontadas com o banco de dados de proteínas da família Bovidae (download em 25/04/2019) 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.

As proteínas identificadas pelo MASCOT como “Uncharacterized” foram analisadas usando o software BLASTp, versão 2.4.0 (Altschul et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais das 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 4.8.8 (Proteome Software Inc., Portland, OR97219). 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). 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.

2.9 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 STRAP, versão 1.5 (MI et al., 2016).

2.10 Análise quantitativa das proteínas identificadas

Das proteínas identificadas foram escolhidas aquelas que estavam presentes em pelo menos três réplicas técnicas de cada grupo. 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 TStudent, 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).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação andrológica de 419 touros da raça Nelore em regime extensivo, 1,67% de touros foram considerados em repouso sexual. Semelhante observação foi feita por Barh e Oko, (1989) cuja incidência dessa condição em 1331 touros Western Canadian Range foi de 1,1%.

Não houve diferenças ($P < 0,05$) nas médias de defeitos menores, defeitos maiores e defeitos totais entre os grupos estudados. A patologia espermática, cabeça isolada normal foi a de maior incidência, nossos resultados diferiram da maioria dos trabalhos com foco no repouso sexual, pois os animais por nós identificados em repouso sexual apresentaram média de 77,7% de espermatozoides morfolologicamente normais na primeira coleta de sêmen (grupo A) não diferindo da última coleta (grupo B) com 84,4%. Já Barth (2007), em coletas diárias de 3 animais acumuladores, constatou aumento de 27% para 73%, 32% para 76%, e 28% para 76%. Sendo a cabeça isolada o defeito de maior incidência de patologia espermática encontrada em todas as coletas.

Tais achados podem ser explicados devido ao fato dos animais do estudo serem oriundos de um programa de seleção genética, desenvolvido para selecionar rigorosamente reprodutores mais eficientes e adaptados aos sistemas de produção brasileiro.

Dentre as características avaliadas para seleção genética está o Perímetro Escrotal (PE), que é uma característica com correlação favorável à porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais (CHACON et al, 1999; MADRID et al., 1988) e tem moderada a alta herdabilidade (0,36 a 0,69) fazendo com que a evolução genética para essa característica seja relativamente rápida. Portanto, ao longo dos mais de 35 anos de melhoramento genético dessa fazenda, a porcentagem de espermatozoides anormais seja baixa devido a seleção genética dos reprodutores. Além disso todos os animais constituem o rebanho base da fazenda e passam por avaliação andrológica anual sendo portanto considerados aptos à reprodução e com histórico reprodutivo normal.

Em relação às características físicas avaliadas do sêmen, houve diferença entre os grupos em relação à motilidade, ao vigor e ao turbilhonamento. No grupo A os animais apresentaram características consideradas insatisfatória para um reprodutor de acordo com o CBRA e no grupo B, que são amostras desses mesmos animais, os valores de motilidade e vigor aumentaram, alterando o status desses touros de inaptos para aptos à reprodução. Provavelmente com as coletas consecutivas, os espermatozoides velhos foram eliminando os da reserva extragonádica, sendo a última coleta proveniente de reservas mais recentes.

Tabela 1. Valores médios das características físicas (turbilhonamento, motilidade e vigor) e morfológicas do sêmen de touros da raça Nelore nos diferentes grupos

Variáveis	Grupo		
	A	B	C
Turbilhonamento*	0.00 ^c	1.00 ^b	4.75 ^a
Vigor*	2.00 ^c	3.00 ^b	4.50 ^a
Motilidade*	28.0 ± 3.7 ^c	70.0 ± 2.7 ^b	90.0 ± 0.0 ^a
Defeitos Maiores	11.7 ± 3.2 ^a	7.3 ± 1.4 ^a	5.5 ± 2.5 ^a
Defeitos Menores	10.7 ± 2.9 ^a	8.3 ± 1.7 ^a	2.8 ± 0.3 ^a
Defeitos totais	22.3 ± 4.5 ^a	15.6 ± 2.1 ^a	8.3 ± 2.8 ^a

* Valores de mediana. Letras diferentes na mesma linha diferem a $P < 0.05$.

A e B: animais em repouso sexual, sendo A sêmen da primeira coleta e B sêmen da última coleta

C: animais controle

Por meio da LC-MS/MS, foram identificadas um total de 93 proteínas no plasma seminal dos touros avaliados. Essas proteínas foram caracterizadas de acordo com o banco de dados do UniProt (Anexo 1), sendo 13 definidas como proteínas não caracterizadas (Anexo 2).

De acordo com os termos de ontologia gênica, as proteínas foram distribuídas de acordo com o processo biológico em que estão envolvidas (Figura 1). A maioria dessas proteínas encontradas estão envolvidas no processo celular (36,22%), na regulação biológica (35,20%) e na interação celular (19,12%). Resultados semelhantes foram reportados por Viana et al. (2018) no plasma seminal de touros *Bos taurus* com alta (24,3%; 23,2% e 8,7%) e baixa fertilidade (24,5%; 22,8%; 8,6%) e por Westfalewicz et al. (2017) no fluido do epidídimo.

Esses autores também tiveram resultados semelhantes a este trabalho em relação às funções moleculares das proteínas, que foram principalmente funções de ligação (49,50 %) e atividade catalítica (35,34%). Entretanto, apesar dos resultados serem similares, existem variáveis em relação às diferentes formas de obtenção e interpretação dos resultados que devem considerados.

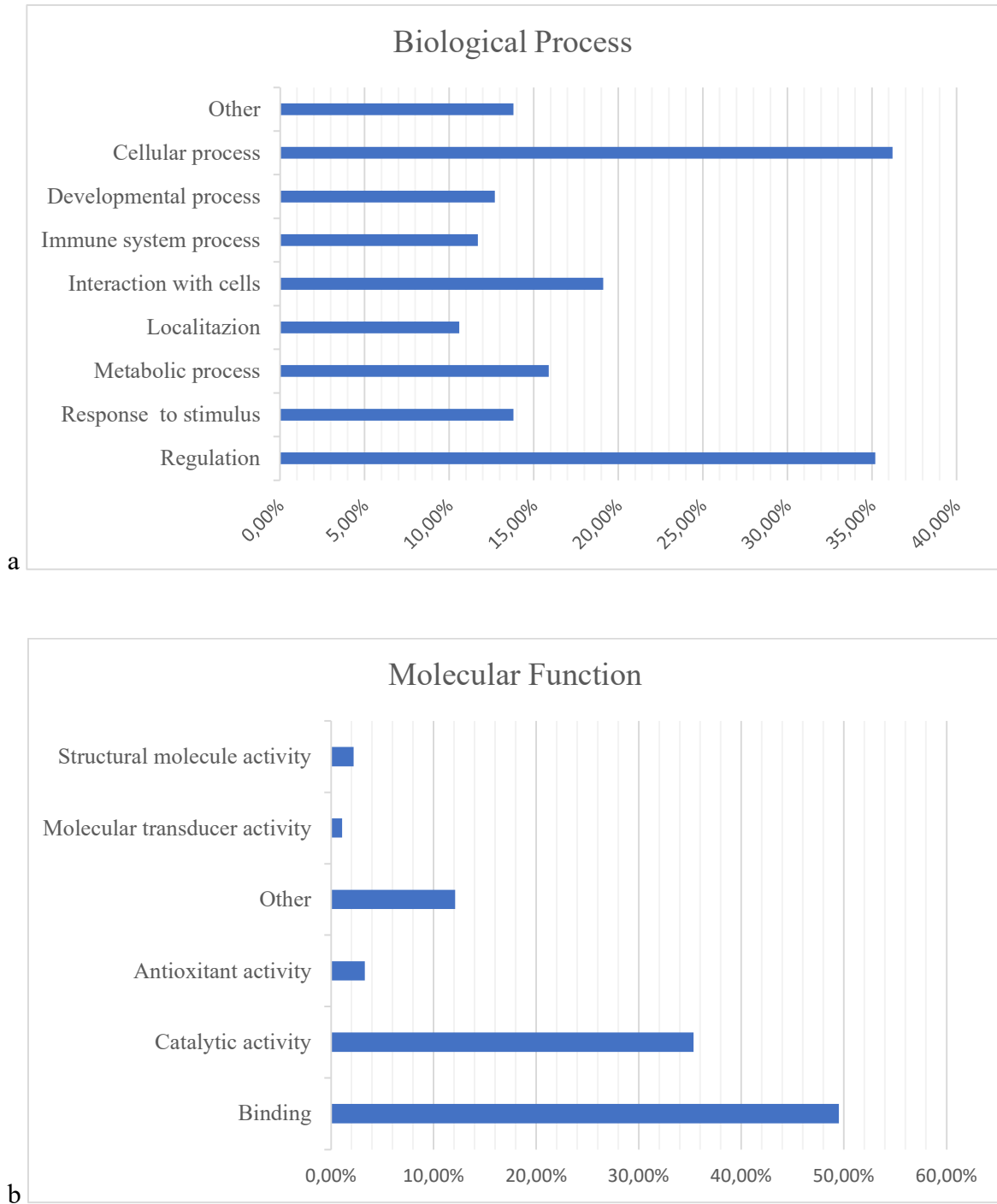


Figura 1. Classificação das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore baseada nos processos biológicos (a) e na função molecular (b). Dados de proteínas foram analisados utilizando o software para pesquisa de anotações de proteínas STRAP. Os termos da ontologia genética foram obtidos a partir do banco de dados UniProtKB.

Na comparação entre os grupos de amostras (primeira coleta, última coleta e controle) das 93 proteínas identificadas, 76 foram encontradas no grupo A, 58 no grupo B, e 60 no grupo controle. Trinta e nove proteínas foram comuns entre os 3 grupos, 6 comuns entre A e B, 12 comuns entre o grupo A e C e 5 comuns entre B e C (Figura 2).

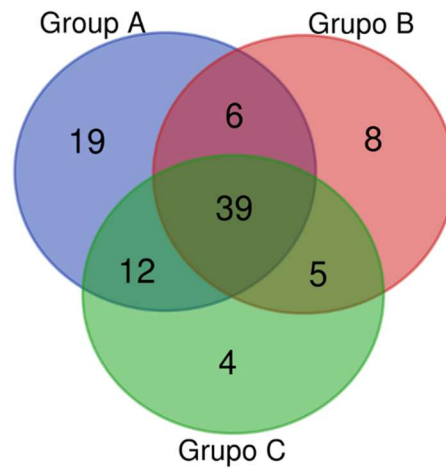


Figura 2. Número de proteínas encontradas no plasma seminal de touros da raça Nelore nos grupos A, B e C. O diagrama de Venn foi erado por Bioinformatics & Evolutionary Genomics platform

A análise de Componentes Principais (PC) é uma análise estatística multivariada que é utilizada para se ter uma visão geral do conjunto de dados e verificar o estabelecimento de possíveis conexões entre os dados, reconhecendo padrões entre as variáveis e agrupando classes de acordo com esses padrões. O gráfico gerado (Score Plot) mostra que amostras com maior similaridade entre si encontram-se mais próximas no gráfico (ENKILDE et al., 2007).

De acordo com o gráfico baseado na análise PC (figura 3) houve clara distribuição de proteínas com diferentes concentrações entre as réplicas analisadas. Essa distribuição agrupou as réplicas em três classes distintas, coincidindo com os grupos que foram comparados. Isso demonstra que realmente há diferença nos perfis proteicos do plasma seminal entre os grupos e que o processamento das amostras foi bem executado já que não houve dispersão de nenhuma réplica.

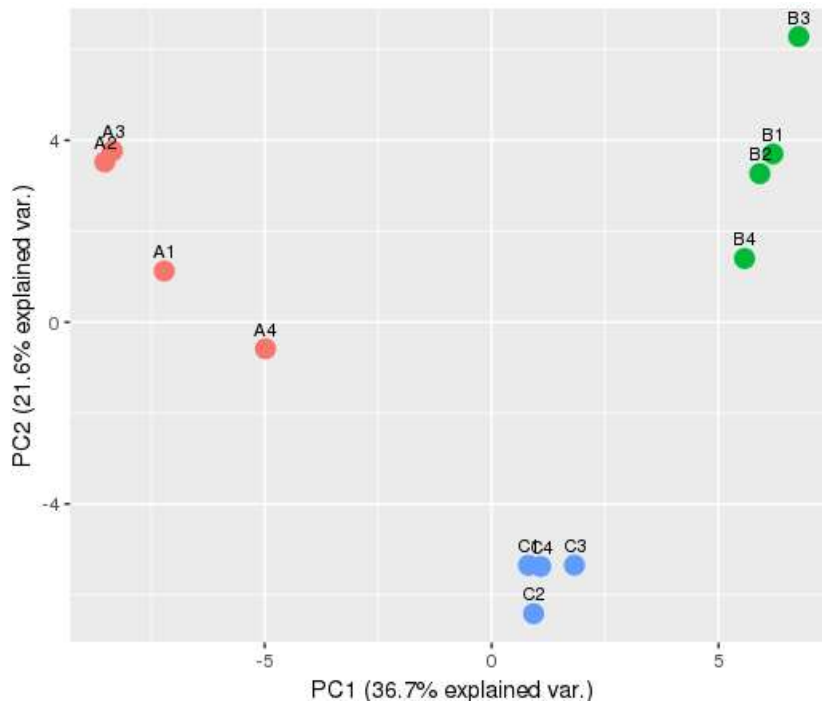


Figura 3. Análise de Componentes Principais (PC), distribuição das réplicas das amostras dos animais dos grupos A, B e C.

Para identificação de proteínas diferencialmente expressas (DEP), os grupos foram contrastados da seguinte forma: A vs B, A vs C e B vs C, de acordo com a quantificação da abundância relativas das proteínas (Label-free proteomics, emPAI). Dessa forma foi detectado no plasma seminal dos touros 6 DEP entre A e B, e 4 DEP entre B e C. Porém não foi detectada nenhuma proteína diferencialmente expressa entre A e C.

Como mostrado na figura 4, entre A e B, primeira e última coleta dos animais em repouso sexual três proteínas (ALBU, NPC2, Z13) foram mais abundantes grupo A e três (SPAD1, CCL2, F1N1Z8) mais abundantes no grupo B. Entre B e C, as proteínas Q4R0H2, SPAD1, foram mais abundantes no grupo C, e NPC2 e Z13 no grupo B.

A Chemokine Ligand-2 (CCL2) também conhecida como Monocyte chemoattractant protein 1 (MPC-1) pertence à família das quimiocinas, são proteína de baixo peso molecular (8 a 10kDa) (DAS e YAN, 2007). As proteínas dessa família são mais conhecidas como agentes pró-inflamatórios, pois recrutam tipos específicos de leucócitos (ALAM et al., 1993).

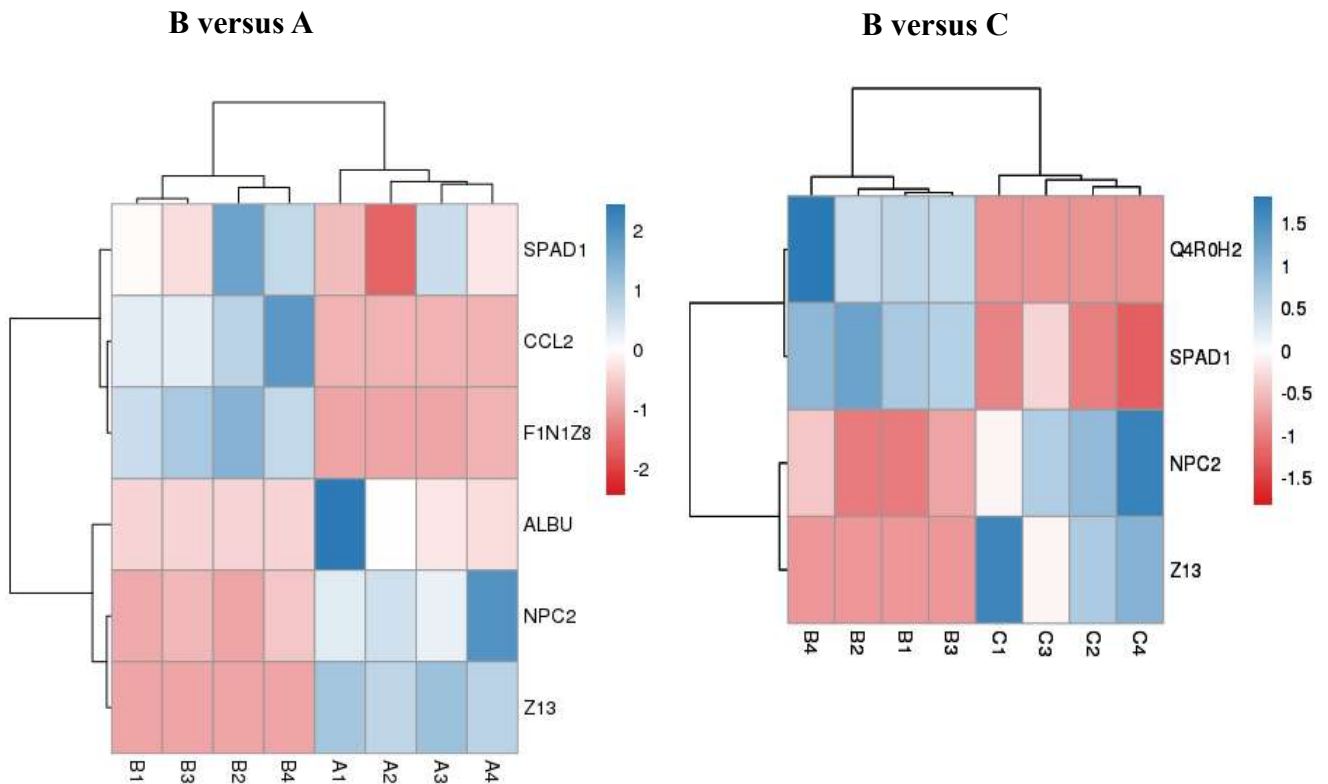


Figura 4. Abundância relativa de proteínas do plasma seminal de touros Nelore entre os grupos. No heatmap, os tons de azul representam alta abundância de proteína e os tons de vermelho baixa abundância de proteínas.

Westfalewicz et al. (2019), ao comparar a qualidade do sêmen criopreservado e o perfil protéico do PS entre estações do ano, obteve menores resultados de motilidade e uma maior abundância da proteína CCL2 no verão, e sugeriu que a atividade pró-inflamatória dessa proteína impactou negativamente sobre a qualidade do sêmen congelado. Da mesma forma, Dietrich et al. (2017) observou que elevadas concentrações de proteínas relacionadas à resposta inflamatória no trato reprodutivo de carpas, estando relacionadas com baixa congelabilidade do sêmen.

Entretanto o mecanismo de como essas substâncias afetam a congelabilidade dos gametas, a localização e o significado funcional dessas quimiocinas na fisiologia do espermatozoide é mal compreendida.

Por outro lado, a CCL2 quando ligado ao seu receptor CCR2 (receptor de chemokine Ligand-2), também provoca influxo de cálcio intracelular (ROLLINS et al., 1991). Vários estudos mostram que processos fisiológicos estão estreitamente relacionados com alterações na concentração de Ca^{2+} no espermatozoide (MARQUEZ et al., 2007; Chung et al., 2014) entre eles a motilidade espermática sendo o Ca^{2+} o principal elemento nessa atividade (DARSZON et al., 1999).

Além disso a presença de CCR (receptor de chemokine Ligand) já foi detectada em espermatozoides de humano e ratos e segundo Caballero-Campo et al. (2014) esses receptores tem funções através da ativação/desativação na motilidade espermática e agem na quimiotaxia no trato reprodutivo masculino e feminino.

A maior abundância da CCL2 no grupo B em relação ao grupo A, talvez seja um dos fatores responsáveis pelo aumento da motilidade espermática no grupo B. Já que a CCL2 estimula o influxo de cálcio para o interior da célula e esse influxo faz parte do mecanismo que induz a motilidade espermática. Possivelmente pela maior necessidade de sinalização celular para o acionar o mecanismo de motilidade dos espermatozoides nos animais em repouso sexual, houve um aumento gradual da expressão da CCL2, já que esses animais apresentavam inicialmente, alta porcentagem de espermatozoides imóveis, funcionando como feedback positivo nesses animais.

No espermatozoide, o Ca^{2+} é transportado via canais de Ca, dos três existentes no gameta masculino, o chamado Catsper, é expresso exclusivamente nos espermatozoides e é responsável por promover a motilidade espermática (SUN et al., 2017).

A CCL2 tem sido pouco estudada em relação ao seu efeito no plasma seminal. Além disso, todas as funções relatadas como sinalização celular, transporte molecular, metabolismo de minerais e vitaminas, lipídios, homeostasia celular (função e manutenção celular), influxo de cálcio, transporte celular, efluxo de colesterol, e evidências de que essas quimiocinas são expressas tanto no trato masculino como no feminino dificultam a interpretação e conclusão dos resultados.

Muitas quimiocinas se ligam a múltiplos receptores e a maioria dos receptores se ligam a múltiplas quimiocinas, sugerindo a possibilidade de redundância funcional. Entretanto existem evidências de que há especificidade nas interações receptor-ligante e que diferentes ligantes induzem diferentes sinais, havendo um controle espacial e temporal de sua expressão (ZLOTNIK e YOSHIE, 2000; GALANDRIN et al., 2008).

Nesse sentido, isso parece explicar o comportamento semelhante da proteína CCL2 com a F1N1Z8 (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like) entre o grupo A e B. Isso devido ao fato de que a superexpressão da F1N1Z8 aumenta a expressão do receptor de quimiocinas CXC tipo 4 (CXCR4) (LEE et al., 2010) que é da mesma família dos CCR2, portanto, assim como a CCL2, a F1N1Z8 aparece em maior abundância no grupo com melhor motilidade espermática. Ainda que de forma indireta, a maior presença da F1N1Z8, pode ter aumentado o número de receptores para a CCL2, aumentando assim sua função biológica e influenciando na maior motilidade espermática do grupo B.

Apesar de haver raras descrições da função da F1N1Z8 na literatura associada com a fertilidade, sua maior abundância no PS de cordeiros está significativamente associada à melhor congelabilidade do sêmen de carneiros (SOLEILHAVOUP et al., 2014).

A proteína F1N1Z8 (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like), é uma proteína associada ao câncer de pâncreas, e acredita-se que ela seja responsável pelo processo de progressão e metástase desse tumor. Embora não tenha o mecanismo de atuação esclarecido, contribui através da proliferação celular, modulação da adesão, migração e invasão celular (LEE et al., 2010; KIM et al., 2014).

A SPADH1 (Spermadhesin-1), apesar de não ter apresentado um resultado homogêneo como as outras DEPs entre as réplicas do mesmo grupo, foi encontrada de forma mais abundante no Grupo B do que no grupo A. Essa proteína está envolvida no processo biológico da fertilização, tem papel de regular do metabolismo espermático e de proteção da membrana espermática do dano oxidativo (SCHONECK et al., 1996). Além disso, possivelmente evita a reação prematura do acrossoma (TOPFER-PETERSEN et al., 1998) pois sua ligação ao espermatozoide se restringe ao acrossoma e se perde após a capacitação (DOSTALOVA et al., 1994).

A presença da SPADH1 no PS de touros foi positivamente associada com a congelabilidade dos espermatozoides e a sua fertilidade (JOBIM et al., 2004; KASIMANICKAM et al., 2018).

Na primeira amostra de sêmen colhida (grupo A), a motilidade espermática foi muito baixa (28%) e foi aumentando gradualmente até atingir média de 70% nas amostras do grupo B. O aumento da expressão da SPADH1 pode ter sido em resposta à essa melhora da motilidade espermática. De forma que, o aumento gradual da motilidade dos espermatozoides, também significa aumento do seu metabolismo, isso gera maiores quantidades de ROS no PS. Além disso, também pode estar relacionada ao aumento simultâneo da CCL2, que apesar de ser importante na motilidade via influxo de Ca^{2+} , esse íon também é regula a capacitação do espermatozoide. Essa modificação do metabolismo dos espermatozoides, demanda maior função de proteção da SPADH1 para o gameta masculino e seu acrossoma.

Ainda em relação a SPADH1, ao se comparar o grupo B com grupo C, a abundância dessa proteína foi maior no grupo B. A menor expressão da SPADH1 nos touros controle, aparentemente indica que o PS destes animais seja um meio mais equilibrado bioquimicamente no que diz respeito às reações de oxidação, já que a motilidade espermática é satisfatória (90%) e tende a se manter constante (em animais controle foi colhida apenas uma amostra de sêmen).

Assim, Menezes et al. (2017), encontrou relação inversa entre a SPADH1 com o vigor espermático de sêmen fresco e a motilidade de sêmen criopreservado.

Além disso, a CCL2 não foi uma DEP nessa comparação (B vs C), fato que corrobora com a hipótese de que ela poderia estar induzindo a capacitação nos espermatozoides do grupo B, fazendo com que a SPADH1 se desacople do acrossoma migrando para o PS.

Tudo isso, também pode ser aplicado à espermadesina 2 (SPADH2 ou Q4R0H2), já que entre o grupo B e o grupo C, se comportou de forma similar à SPADH 1, encontrando-se mais abundante no grupo dos animais controle.

A espermadesina Z13 se liga à superfície do espermatozoide (TOPFER-PETERSEN et al., 1998) e tem sido relatada como um fator anti-fertilidade (KILLIAN et al., 1993) pelo fato de altas concentrações dessa proteína afetar a qualidade espermática (SARSAIFI et al., 2015), estando inversamente relacionada com a fertilidade de touros (MOURA et al., 2006). No entanto, em condições *in vitro* em concentrações médias há efeitos positivos sobre os espermatozoides bovinos, porém em níveis elevados pode inibir a motilidade dos espermatozoides e a atividade mitocondrial (SCHONECH et al., 1996 citado por KASIMANICKAM et al., 2019).

Moura et al. (2006) sugeriram que essa baixa fertilidade pode ser atribuída à habilidade da espermadesina em alterar aspectos da motilidade do espermatozoide, mas também acreditavam que o modo como influenciam na motilidade é dose-dependente.

No contraste A vs B, houve maior abundância na expressão da espermadesina 13 no grupo A. A maior abundância dessa proteína no grupo A em relação ao B, parece ter impactando negativamente sobre a motilidade dos espermatozoides, fazendo com que essa fosse menor em A.

Complementarmente em B vs C, a expressão da Z13, foi menor em B e maior em C. Corroborando com a teoria de Moura et al. (2006) de que o mecanismo pelo qual as espermadesinas atuam sobre os espermatozoides é dose-dependente. E no caso do grupo C, a maior abundância da Z13 não interferiu negativamente na motilidade. Assim, a Z13 foi positivamente associada à fertilidade de touros (MENEZES et al., 2017), com a motilidade espermática e ao vigor de espermatozoides criopreservados (SOMASHEKAR et al., 2017).

A proteína Transportador intracelular de colesterol 2 (NPC2) tem papel fundamental na regulação do transporte de colesterol intracelular e homeostase e foi detectada em vários tecidos diferentes ou fluidos secretados, como leite, bile e plasma, indicando amplo significado biológico e extracelular. Entretanto a participação da NPC2 na homeostase do colesterol *in vivo*

e suas funções no plasma ainda não foram descobertas e existem poucos dados publicados a respeito dessa proteína (KLEIN et al., 2006; XU et al., 2019)

Considera-se que a NPC2 é uma das proteínas com maior afinidade ao colesterol (MANASKOVA-POSTLEROVA et al., 2011), estando intimamente relacionada com a estrutura lipídica da membrana plasmática, e é a mais secretada no epidídimo de humanos (OKAMURA et al., 1999). LEGARE et al. (2006) também relatou secreção pelas vesículas seminais, próstata e ducto deferente.

Altos níveis dessa proteína no plasma seminal foram relacionados à alta taxa de colesterol na membrana espermática pois ela se liga mais eficientemente nos espermatozoides com maior teor de colesterol (LEGARE et al., 2006). Esse fato sugere uma maior proteção do espermatozoide durante o congelamento/descongelamento do sêmen e, portanto, melhor congelabilidade em animais com maiores concentrações de NPC2 no os. Além disso, quando espermatozoides foram incubados em PS rico em NPC2, essa proteína se aderiu ao espermatozoide, diminuindo sua concentração no meio (VALENCIA et al., 2017).

Em nosso trabalho entre os grupos A e B, maior expressão da NPC2 foram detectadas no grupo A. Portanto acreditamos que a menor abundância dessa proteína no grupo B seja devido a ligação da mesma nos espermatozoides, assim como nos trabalhos de VALENCIA et al. (2017).

Já na comparação dos grupos B vs C, a maior abundância no grupo B corrobora os resultados de LEGARE et al. (2006), que ao compararem a abundância da NPC2 no PS de homens vasectomizados e férteis, apesar dos resultados terem apresentado grande variação individual, essa proteína foi aproximadamente 40% menor nos indivíduos que tinham obstrução do vaso deferente acumulando espermatozoides. Esses autores ainda sugerem que, em indivíduos vasectomizados há um “down-regulation” da expressão da NPC2 que afeta o processo normal de maturação dos espermatozoides, aumenta o colesterol nessas células e diminui a motilidade espermática.

Houve diferença de abundância entre dos grupos A e B, sendo maior no primeiro grupo. Entretanto, ao se analisar o heat map (figura 3 a) isso parece ter sido efeito de apenas em uma réplica (A1) do grupo A, que foi responsável por aumentar a média da abundância relativa neste grupo.

A ALBU é uma proteína multifuncional, e está envolvida em vários aspectos da homeostase do PS, da qualidade de sêmen (ELZANATY et al., 2007), o metabolismo de lipídeos e da resposta inflamatória (WESTFALEWICZ et al., 2007).

A diminuição dessa proteína no plasma seminal do grupo A para o grupo B, assim como relatado por Byrne et al. (2012) e Westfalewicz et al. (2007) pode significar que a ALB foi adsorvida pelos espermatozoides, e detectada em menor quantidade no PS.

Lindholmer et al. (1974) verificaram uma significativa correlação positiva entre a ALB e a concentração espermática, porém não encontraram correlação com a motilidade espermática. Isso coincide com nossos achados pois, houve maior abundância de ALB no grupo A, que são amostras dos animais em repouso sexual colhidas no primeiro tempo e, portanto, mais concentradas (BARTH, 2007).

Elzanaty et al. (2007) também encontraram correlação positiva entre a ALBU e o tempo de abstinência sexual em humanos, que pode ser explicada pela constatação de que a atividade secretora do epidídimo e da próstata aumentam com um período mais longo de abstinência sexual (COOPER et al., 1993; ELZANATY et al., 2005).

Entretanto a ALB tem capacidade de se ligar aos radicais livres, protegendo os espermatozoides da peroxidação lipídica. E de acordo com Kasimanickam et al. (2019) a baixa expressão de ALB no PS foi apontada como causa do aumento da produção de ROS, contribuindo para a baixa qualidade seminal e baixa congelabilidade de espermatozoides.

4. CONCLUSÃO

- Este é o primeiro trabalho a realizar análise proteômica do plasma seminal de animais em repouso sexual.
- O Repouso sexual em touros Nelore não afetou os padrões de morfologia espermática em touros selecionados geneticamente.
- O plasma seminal dos animais em repouso sexual apresenta perfis proteômicos diferentes em relação ao tempo de coleta em relação aos animais não acometidos por essa condição.
- O efeito das proteínas do plasma seminal sobre os espermatozoides depende não somente da presença ou ausência, mas também da abundância em que ela é secretada.
- A interpretação dos resultados das análises proteômicas associados ao metabolismo espermático é de difícil interpretação devido a discrepâncias nos estudos em relação a identificação de proteínas e sua associação com a qualidade espermática.

-As diferenças nos perfis de proteínas observadas no presente estudo em comparação com outros estudos podem ser devidas à variação nas espécies, protocolos de digestão usados para extração de proteína espermática e a otimização dos parâmetros de identificação de proteínas por espectrometria de massa.

5. REFERÊNCIAS

ALBERTS M., STOUT T.A.E., STOORVOGEL, W. Prostatomes: extracellular vesicles from the prostate, **Reproduction**, v.16, p.147, 2014.

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Breed report- Perfil da Pecuária no Brasil
<http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf> 22/07/2019

ALAM, R., STAFFORD, S., FORSYTHE, P., HARRISON, R., FAUBION, D., LETT-BROWN, M. A., GRANT J.A., RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. **Journal of Immunology**, v.150, p.3442–3448, 1993.

AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. Equine Reproduction, 2 edição Vol. 1, Editores: McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E. and Dickson, D.D., Wiley-Blackwell, Ames. pp 881-908, 2011

TÖPFER-PETERSEN E, ROMERO A, VARELA PF, EKHLASI-HUNDRIESER M, DOSTÁLOVÁ Z, SANZ L, CALVETE JJ. Spermadhesins: a new protein family: facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v.30, p.217-224, 1998

ARAKI, N., KAWANO, N., KANG, W., MIYADO, K., YOSHIDA, K., AND YOSHIDA, M. Seminal vesicle proteins SVS3 and SVS4 facilitate SVS2 effect on sperm capacitation. **Reproduction**, v.152(4), p.313-321, 2016.

BAKER, M.A., NIXON, B., NAUMOVSKI, N., AITKEN, R.J. Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v58, p211-217, 2012.

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 Veterinaer medicin**, v.35, p.105-130, 1973.

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.

BRATANOV, K., SOMLEV, B., DOYCHEVA, M., TORNYOV, A., EFREMOVA V., Effect of kallikrein on bull sperm motility in vitro. **International Journal of Fertility** v.23, p.73-75, 1978

BRINKS JS. Relationships of scrotal circumference to puberty and subsequent reproductive performance in male and female offspring. In: Fields MJ, Sand RS, editors. Factors affecting calf crop. Boca Raton: CRC;. pp. 363–70. 4. 1994

BROMFIELD J.J., SCHJENKEN J.E., CHIN P.Y., CARE A.S., JASPER M.J., ROBERTSON S.A. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v111 (6), p2200-2205, 2014

BYRNE, K., LEAHY, T., MCCULLOCH, R., COLGRAVE, M.L., HOLLAND, M.K., Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. **Proteomics**, v12, p.3559–3579, 2012.

SCHÖNECH, C., BRAUN, J., EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSPF: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v.45, p.633-642, 1996.

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

CHACON J., PEREZ E., MULLER E., SODERQUIST L., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica **Theriogenology**, 52, pp. 221-231, 1999.

CHUNG JJ, SHIM SH, EVERLEY RA, GYGI SP, ZHUANG X, CLAPHAM DE. Structurally distinct ca(2+) signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell.*, v.157(4), v.808–822, 2014.

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

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

COOPER TG, KECK C, OBERDIECK U, NIESCHLAG E Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. **Human Reproduction**, v.8, p.1251–1258, 1993.

DA SILVA, B. F., C. MENG, D. HELM, F. PACHL, J. SCHILLER, E. IBRAHIM, C. M. LYNNE, N. L. BRACKETT, R. P. BERTOLLA, AND B. KUSTER. “Towards Understanding Male Infertility after Spinal Cord Injury Using Quantitative Proteomics.” **Molecular & Cellular Proteomics** v15.4 p1424-34, 2016.

DACHEUX J.L., BELGHAZI M., LANSON Y., DACHEUX F. Human epididymal secretome and proteome, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v250, p.36-42, 2006

DARSZON A, LABARCA P, NISHIGAKI T, ESPINOSA F. Ion channels in sperm physiology. **Physiological Reviews** v.79, p.481–510, 1999.

DIETRICH M.A., IRNAZAROW, I., CIERESZKO A. Proteomic identification of seminal plasma proteins related to the freezability of carp semen **Journal of Proteomics**, v162, (), p.52-61, 2017

DOSTALOVA, Z., CALVETE, J.J., SANZ, L., HETTEL, C., RIEDEL, D., SCHONECK, C., EINSPANIER, R., TOPFER-PETERSEN, E., Immunolocalization and quantitation of acidic

seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa, **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v.375, p.457–461, 1994.

DRUART, X., RICKARD, J.P., MACTIER, S., KOHNKE, P.L., KERSHAW-YOUNG, C.M., BATHGATE, R., GIBB, Z., CROSSETT, B., TSIKIS, G., LABAS, V., HARICHAUX, G., GRUPEN, C.G., DE GRAAF, S.P., Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics** v91, p13–22, 2013.

ELZANATY S, MALM J, GIWERCMAN A, Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. **Human Reproduction** v.20, p.221–225, 2005

ELZANATY, S., ERENPREISS, J., BECKER, C. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters, **Andrologia**, v39, pp. 60-65, 2007.

ENKILDE, K.; JACOBSEN, S.; SØNDERGAARD, I. Multivariate data analysis of proteome data. **Methods in Molecular Biology**, v. 355, p. 195-210, 2007.

FLOWERS, W.L. Sperm characteristics that limit success of fertilization **Journal Animal Science**, v91, p3022-3029, 2013

FOUCHÉCOURT, S., CHARPIGNY, G., REINAUD, P., DUMONT, P., DACHEUX, J.L., Mammalian lipocalin-type prostaglandin D2 synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions **Biology of Reproduction**, v.66, p.458-467, 2002.

FOUCHÉCOURT, S., MÉTAYER, S., LOCATELLI, A., DACHEUX, F., DACHEUX, J.L., Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins **Biology of Reproduction**, v.62, p. 1790-1803, 2000.

Galandrin S, Oligny-Longpre G, Bonin H, Ogawa K, Gales C, Bouvier M. Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor. **Molecular Pharmacology**, v.74, p.162–172, 2008.

GIANOLA D, GIBB JB. Estimates of heritabilities and of genetic and phenotypic correlations among growth and reproductive traits in yearling Angus bulls. **Journal of Animal Science** Revista académica v.58, p.887, 1984

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

HINTON, B.T., PALLADINO, M.A., RUDOLPH, D., LABUS, J.C, The epididymis as protector of maturing spermatozoa **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 731-745, 1995

ISOBE T., MINOURA, H., TANAKA, K., SHIBAHARA, T., HAYASHI, N., TOYODA, N., The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. **Human Reproduction**, v17, p.1441–1446, 2002.

- JOBIM, M.I., OBERST, E.R., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O., WALD, V.B., TRAMONTINA, F., MATTOS, R.C., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology** v.61, p.255–266, 2004.
- JODAR, M., SENDLER, E., KRAWETZ, S.A. The protein and transcript profiles of human semen **Cell and Tissue Research**, v363, p. 85-96, 2016.
- VALENCIA, J., GÓMEZ, G., LÓPEZ, W., MESA, H., HENAO, F. J., Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. **Journal of Animal Science and Biotechnology** v.8, p.21, 2017.
- KASIMANICKAM, R.K., KASIMANICKAM, V.R., ARANGASAMY, A., KASTELIC, J.P. Sperm and seminal plasma proteomics of high- versus low-fertility Holstein bulls. **Theriogenology**, v.126, p41-48, 2019.
- KASTELIC, J. P., COOK, R. B., PIERSON, R. A., & COULTER, G. H., Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, v.65(2), p.111–115, 2001.
- KAWANO, N., ARAKI, N., YOSHIDA, K., HIBINO, T., OHNAMI, N., MAKINO, M., KANAI, S., HASUWA, H., YOSHIDA, M., MIYADO, K., AND UMEZAWA, A., Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. Proceedings of the **National Academy of Sciences of the United States of America** v.111(11), p.4145-4150, 2014
- KILLIAN GJ, CHAPMAN DA, ROGOWSKI LA Fertility-associated proteins in bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202–1207,1993
- KIM YH, MOON JY, KIM EO, LEE SJ, KANG SH, KIM SK, HEO K, LEE Y, KIM H, KIM KT, KIM D, SONG MS, LEE SW, LEE Y, KOH SS, KIM IH, Efficient targeting and tumor retardation effect of pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF)-specific RNA replacement in pancreatic cancer mouse model. **Cancer Letters**, v.344(2), p.223-231, 2014.
- KLEIN, A., AMIGO, L., RETAMAL, M. J., MORALES, M. G., MIQUEL, J. F., RIGOTTI, A. AND ZANLUNGO, S., NPC2 is expressed in human and murine liver and secreted into bile: Potential implications for body cholesterol homeostasis. **Hepatology**, v.43, p.126-133, 2006.
- LAEMMLI, K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p. 680, 1970.
- LASSERRE A, BARROZO R, TEZÓN JG, MIRANDA PV, VAZQUEZ-LEVIN MH, Human epididymal proteins and sperm function during fertilization: un update. **Biological Research**, v.34(3-4), p.165-78, 2001.
- LEAHY, T., DE GRAAF, S.P., Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.207–213, 2012.

LEE Y, KIM SJ, PARK HD, PARK EH, HUANG SM, JEON SB, KIM JM, LIM DS, KOH SS. PAUF functions in the metastasis of human pancreatic cancer cells and upregulates CXCR4 expression. **Oncogene**, v.29, p.56–67, 2010.

LÉGARÉ C, THABET M, GATTI JL, SULLIVAN R HE1/NPC2 status in human reproductive tract and ejaculated spermatozoa: consequence of vasectomy. **Molecular Human Reproduction**, v.12(7), p.461-468, 2006.

LEVITAS, E., LUNENFELD, E., WEISS, N., FRIGER, M., HAR-VARDI, I., KOIFMAN, A. AND POTASHNIK, G. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: Analysis of 9,489 samples. **Fertility and Sterility**. v.83, p1680-1686, 2005.

LIEBLER, D. C.; HAM, A. J. L. Spin filter-based sample preparation for shotgun proteomics. *Nature Methods*, v. 6, n. 11, p. 785, 2009.

LINO, B.F., BRADEN, A.W., The output of spermatozoa in rams. I. Relationship with testicular output of spermatozoa and the effect of ejaculations. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.25, p.351-358, 1972.

LOAIZA-ECHEVERRI AM, BERGMANN JAG, TORAL FLB, OSORIO JP, CARMO AS, MENDONCA LF, ET AL. Use of nonlinear models for describing scrotal circumference growth in Guzerat bulls raised under grazing conditions. **Theriogenology**; v.79, p751–759. 2013

LU, J., STEWART, A.J., SADLER, P.J., PINHEIRO, T.J., BLINDAUER, C.A., Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. **Biochemical Society Transactions** v.36, p.1317-1321, 2008

LUCAS, E.S., WATKINS A.J., The long-term effects of the periconceptional period on embryo epigenetic profile and phenotype; the paternal role and his contribution, and how males can affect offspring's Phenotype/Epigenetic profile **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v1014, p137-154, 2017

MADRID N., RAO VEERAMACHANENI D.N., PARRETT D.F., VANDERWERT W., WILLMS C.L. Scrotal circumference, seminal characteristics, and testicular lesions of yearling Angus bulls **American Journal of Veterinary Research**, v49, p. 579-585 1988.

MAGALHÃES, M.J., MARTINS, L.F., SENRA, R.L., SANTOS, T.F., OKANO, D.S., PEREIRA, P.R., FARIA-CAMPOS, A.C., CAMPOS, S.V., GUIMARÃES, J.D., & BARACAT-PEREIRA, M.C. Differential abundances of four forms of Binder of Sperm 1 in the seminal plasma of *Bos taurus indicus* bulls with different patterns of semen freezability. **Theriogenology**, v86, p.766-777, 2016

MANASKOVA-POSTLEROVA P, DAVIDOVA N, JONAKOVA V. Biochemical and binding characteristics of boar epididymal fluid proteins *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* v.879, p.100–106 2011

MANESH K.P.S., ASHOK, A. Update on the proteomics of male infertility: A systematic review **Arab Journal of Urology** v.16, p.103-112, 2018.

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**, v65, p217–228, 2007

MANJUNATH, P., LEFEBVRE, J., JOIS, P.S., FAN, J.J., WRIGHT, M.W. New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biology of Reproduction**, v.80, p.394-397, 2009.

MARQUEZ B, IGNOTZ G, SUAREZ SS. Contributions of extracellular and intracellular Ca^{2+} to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate Catsper1 and Catsper2 null sperm. *Developmental Biology*, v.303(1), p.214–221, 2007

MAXWELL W.M., DE GRAAF S,P, GHAOUI REL-H, EVANS G. Evans Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility . **Society for Reproduction and Fertility**, v64, p13-38, 2007.

MCCUE, P.M., SCOGGIN, C.F., MOFFETT P.D., BURDEN, C.A., FERRIS, R.A., Spermiostasis in stallions: a retrospective study of clinical cases, **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.47, 2014

MILARDI, D., GRANDE, G., VINCENZONI, F., CASTAGNOLA, M., MARANA, R. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. **Molecular Reproduction Development**, v 80, p 350-357, 2013

MOORE, H.D.M, Post-testicular sperm maturation and transport in the excurrent duct. **Gametes—The Spermatozoon**, Editora: Cambridge University Press, p.140-157, 1995

MOURA, A., CHAPMAN, D., KOC H, KILLIAN G, Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Jounarl of Andrology** 27, p534–541, 2006

MOURA, A.A., SOUZA, C.E., STANLEY, B.A., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls, **Journal of Proteomics**, v73, p2006-2020, 2010.

NOTTER DR, MCFADDEN LG, BERGMANN JAG. Relationship between yearling scrotal circumference and measures of female reproduction in Angus cattle. *BIF* 1993; 180-4.

OKAMURA N, KIUCHI S, TAMBA M, KASHIMA T, HIRAMOTO S, BABA T, et al. A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis HE1, specifically binds cholesterol. **Biochimica et Biophysica Acta**,v.1438, p.377-387, 1999

PICKETT, B.W., SULLIVAN, J.J., SEIDEL, G.E. JR., Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of ejaculation frequency on seminal characteristics and spermatozoal output. **Journal of Animal Science** v.40, p.917-923 1975

REGO, J.P, CRISP, J.M., MOURA, A.A., NOUWENS, A.S., LI, Y., VENUS, B., CORBET, N.J, CORBET, D.H., BURNS, B.M., BOE-HANSEN, G.B., MCGOWAN, M.R. Seminal plasma proteome of electro ejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**. v148, p1–17, 2014.

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.

ROBERTS, K.P., WAMSTAD, J.A., ENSRUD, K.M., HAMILTON D.W. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1 **Biology of Reproduction**, v.69, p. 572-581, 2003

ROBERTSON S.A., SHARKEY D.J. Seminal fluid and fertility in women **Fertility and Sterility**, v106 (3), p511-519, 2016.

ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell and Tissue Research**, v322, p43–52 2005

ROCHE, M., RONDEAU, P., SINGH, N.R., TARNUS, E., BOURDON, E. The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS Letters** v.582: p.1783-178, 2008

ROLLINS B.J., SUNDAY, M.E., Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells *Molecular and Cellular Biology*., v.11, pp. 3125-3131, 1991

SALANGA CL, O'HAYRE M, HANDEL T., Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v66(8), p.1370–1386, 2009

SANTANA JR., M.L., ELER, J.P., FERRAZ, J.B.S. AND MATTOS E.C., Genetic relationship between growth and reproductive traits in nellore cattle. **Animal**, 6, 565–570, 2012

SARSAIFI, K., HARON, A.W., VEJAYAN, J., YUSOFF, R., HANI, H., OMAR, M.A., HONG, L.W., YIMER, N., JU, T.Y., OTHMAN, A.M., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. **Theriogenology** v.84, p.956–968, 2015.

SARSAIFI, K., HARON, A.W., VEJAYAN, J., YUSOFF, R., HANI, H., OMAR, M.A., HONG, L.W., YIMER, N., YING JU, T., OTHMAN, A.M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. **Theriogenology** v84, p.956-968, 2015.

SEGABINAZZI, L.G., SILVA, L.F., OKADA, C., MEDRADO, F, PAPA, F., ALVARENGA, M. A., Plugged Ampullae in a Donkey Stallion (*Equus asinus*), **Journal of Equine Veterinary Science**, Volume 63, 2018, Pages 24-26,

TAMBA, S., YODOI, R., SEGI-NISHIDA, ERI, ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., SUGIMOTO, Y., Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v105 (38) 14539-14544; 2008

SOMASHEKAR, L., SELVARAJU, S., PARTHIPAN, S., PATIL, S.K., BINSILA, B.K., VENKATASWAMY, M.M., KARTHIK BHAT, S., RAVINDRA, J.P., Comparative sperm

protein profiling in bulls differing in fertility and identification of phosphatidylethanolamine-binding protein 4, a potential fertility marker. **Andrology** v.5, p.1032–1051, 2017.

SOMASHEKAR, L., SELVARAJU, S., PARTHIPAN, S., RAVINDRA, J.P., Profiling of sperm proteins and association of sperm PDC-109 with bull fertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine* v.61, p.376–387, 2015

SOSTARIC, E., KRAAN, H, STOUT, T.A.E Role of seminal plasma in the attainment of fertilizing capacity by stallion epididymal sperm, **Animal Reproduction Science** v107, p 237-248, 2010.

SOUZA, C.E., REGO, J.P., LOBO, C.H., OLIVEIRA, J.T., NOGUEIRA, F.C., DOMONT, G.B., FIORAMONTE, M., GOZZO, F.C., MORENO, F.B., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O., FIGUEIREDO, J.R., MOURA, A.A., Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics** v.75, p.4436-56, 2012

Sozzani S., Molino M., LUINI, W., CERLETTI, C., VECCHI, A., MANTOVANI, A Receptor-activated calcium influx in human mono-cytes exposed to monocyte chemotactic protein-1 and related cytokines **The Journal of Immunology** v150, pp.1544-1553

STOUT, M.A., "Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same Holstein bulls". Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College Degree Doctor of Philosophy (PhD); Department Animal Science (Animal, Dairy, and Poultry Sciences, Dissertação 2012. Disponível em:

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

SULLIVAN, R., FRENETTE, G., GIROUARD, J., Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit **Asian Journal of Andrology**, v9, pp.483-491 2007.

SUN, X. H., ZHU, Y. Y., WANG, L., LIU, H. L., LING, Y., LI, Z. L., & SUN, L. B. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. **Reproductive biology and endocrinology** v.15(1), p65. 2017

SYNTIN, P., DACHEUX, F., DRUART, X., GATTI, J.L., OKAMURA, N., DACHEUX, J.L, Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis **Biology of Reproduction**, v.55, p. 956-974, 1996.

TÉRIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**. v61, p590–598, 1999.

TOPFER-PETERSEN E, ROMERO A, VARELA PF, EKHLASI-HUNDRIESER M, DOSTALOVA Z, SANZ L, CALVETE JJ Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia** v.30 p217–224 1998

VAN TILBURG, M.F., SALLES, M.G., SILVA, M.M., MOREIRA, R.A., MORENO, F.B., MONTEIRO-MOREIRA, A.C., et al., Semen variables and sperm membrane protein profile

of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3°S). *International Journal of Biometeorology* v.59, p.561-73, 2015.

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

VILLAMIL PR, MARULANDA VH, MARTINS JAM, OLIVEIRA AN, AGUIAR LH, et al. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine *in vitro* embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. *Theriogenology*, v85, p540-554. 2016

WESTFALEWICZ, B.; M.A. DIETRICH, A. MOSTEK, A. PARTYKA, W. BIELAS, W. NIŻAŃSKI, A. CIERESZKO Identification and functional analysis of bull (*Bos taurus*) cauda epididymal fluid proteome *Journal of Dairy Science* v.100, 6707 – 6719 2017

WESTFALEWICZ, B., DIETRICH, M., SŁOWIŃSKA, M., JUDYCKA, S., CIERESZKO, A., Seasonal changes in the proteome of cryopreserved bull semen supernatant, *Theriogenology*, v.126, p.295-302, 2019.

ZLOTNIK A, YOSHIE O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*.v.12, p.121-1277, 2000.

CAPÍTULO 2

PARÂMETROS REPRODUTIVOS E CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE TOUROS 3/4 E 5/8 HOLANDÊS X GIR

1. INTRODUÇÃO

O potencial da pecuária brasileira ainda se mostra muito grande diante do mercado consumidor brasileiro e mundial. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura FAO (2018) a população humana mundial está estimada em 20 bilhões de habitantes pra o ano de 2050. Atualmente o Brasil possui o segundo maior rebanho comercial do mundo, perdendo somente para os Estados Unidos da América e é o maior produtor de carne bovina do mundo e entre os maiores países produtores de leite.

O rebanho comercial é constituído em sua maioria por raças de origem indiana ou zebuínas, raças que apresentam menor produção de leite/lactação/animal quando comparada às raças de origem taurina, principalmente as raças Holandesa, Jersey e Pardo Suíça. No entanto, essas raças, predominantemente de origem do hemisfério norte, onde a condições de temperatura são muito favoráveis às condições fisiológicas dos animais (homeostasia) quando comparadas às condições climáticas dos países do Hemisfério Sul cuja maioria das regiões não oferecem condições climáticas favoráveis para propiciarem condições de conforto para os animais, tornando-os menos produtivos, mesmo para as raças mais produtivas. Demonstrando assim, o efeito ambiental sobre a fisiologia desses animais (FAÇANHA et al., 2013).

Em países tropicais, a temperatura e a umidade relativa do ar são muito mais elevadas que em países de clima temperado, de modo que o manejo para as raças leiteiras de origem de clima temperado exigem dos produtores o uso de técnicas de manejo e alimentação mais dispendiosas e muitas vezes não atendem as necessidades fisiológicas para que o animal atinja seu potencial produtivo, ficando muito aquém do desejado, além de apresentarem vida produtiva e reprodutiva abaixo dos índices alcançadas pelos animais criados em regiões de clima temperado (COLLIER et al., 2006; DAS et al., 2016).

Diante deste quadro, muitos criadores brasileiros passaram a desenvolver plantéis de bovino para aptidão leiteira com raças zebuínas, inicialmente com animais da raça Nelore, Indubrasil, Gir, Guzerá e Sindi, sendo que a primeira atualmente possui aptidão somente para produção de carne. Contudo, apesar de haver grandes plantéis dessas raças em diferentes regiões do no Brasil, a produção desses animais se mostra muito abaixo daquelas apresentadas pelas raças de origem taurina, provavelmente pela falta de programa de seleção para leite em

tempos iniciais da criação desses rebanhos. Atualmente há programas de seleção, não somente baseados em morfologia, mas também empregando as características de produção, Os programas de melhoramentos, embora recentes, já demonstram resultados no progresso genético dos rebanhos, apesar de serem pouco expressivos (FACÓ et al., 2002)

Neste contexto, uma das grandes alternativas surgidas entre os criadores de rebanho leiteiro foi o cruzamento entre as raças de aptidão leiteira de origem taurina com as raças zebuínas, principalmente as raças Gir (Girolando) e Guzerá (Guzolando). Dentre esses cruzamentos o Girolando se destaca, sendo a raça a mais difundida no Brasil e apresentando satisfatória produção de leite, com manejo mais acessíveis aos produtores, vida produtiva e reprodutiva mais longa e melhor adaptabilidade ao clima tropical em relação às raças taurinas puras e outros cruzamentos praticados nas condições climáticas do Brasil (LIMA et al., 2013).

No Brasil 70% da produção de leite é oriunda de raças mestiças Holandês-Zebu (EMBRAPA, 2003) não considerando os rebanhos que não são controlados pela Associação Brasileira de Criadores de Girolando. Em sua maioria, o cruzamento praticado para a obtenção do Girolando é feito com uso de sêmen de reprodutores da raça Holandesa em fêmeas da raça Gir e em fêmeas Holandês x Gir, exigindo assim o emprego da inseminação artificial e infraestrutura para sua implantação, o que dificultava a maior difusão da raça pelo país junto aos pequenos produtores. Contudo, há algumas décadas, com a implantação de plataforma de ação de difusão da raça, a Associação Brasileira de Criadores de Girolando, vem orientando os produtores na seleção de reprodutores da raça Girolando para uso em manejo de monta natural ou como doadores de sêmen em Centrais de Inseminação. Isso possibilitou o cruzamento entre animais Girolando ou mesmo a obtenção de animais Girolando, diminuindo a necessidade do uso de sêmen ou reprodutor da raça Holandesa quando para uso em rebanhos da raça Gir ou mestiços Holandês x Gir, ou uso de reprodutor da raça Gir para uso em rebanho de vacas Holandesas e mestiças Gir x Holandês (SILVA, et al. 2019; CANAZA-CAYO et al., 2014).

Desde modo, no programa de Melhoramento Genético tem-se dado ênfase às características genealógicas, produtivas e reprodutivas do rebanho e dos potenciais reprodutores a serem comercializados. Para tanto a Associação Brasileira de Criadores de Girolando, possui parceria com a EMBRAPA Gado de leite e a Universidade Federal de Viçosa - UFV, as quais são responsáveis, respectivamente, pela Seleção Genética das matrizes e dos reprodutores. Após a seleção genética, os reprodutores passam por diversas avaliações andrológicas (doadores de sêmen e para uso em monta natural), comportamentais e de congelabilidade de sêmen para serem aprovados como doadores de sêmen (GONÇALVES et al., 2019).

Estudos anteriores têm demonstrado grande variação nos parâmetros reprodutivos (maturidade sexual, qualidade seminal, congelabilidade e principalmente sobre a longevidade dos animais na produção de sêmen) o que tem induzido a implantação de maior rigor no processo de seleção desses animais (BRUSHI, 1997, GUIMARÃES, 1997, GUIMARÃES, 2005). No entanto, esses estudos tiveram como objetivo avaliar o efeito ou a relação dos graus de sangue com as características produtivas, reprodutivas e congelabilidade do sêmen.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a características seminais e as biometrias dos órgãos genitais de dois grupamentos genéticos da raça Girolando e verificar sua relação com a congelabilidade do sêmen em um programa de seleção de touros da raça Girolando.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais do presente estudo foram manejados de acordo com as normas de conduta preconizadas pelo CONCEA para uso de animais em ensino, pesquisa e extensão, e foram aprovadas pela Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Viçosa - UFV, processo n. 89/2017, em 23 de março de 2018.

2.1. Local, animais e manejo

Este experimento foi conduzido em uma unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão do Instituto Federal do Triângulo Mineiro, situada no município de Uberaba – MG, coordenadas geográficas de 19°39'17.1" na latitude e 47°57'41,4" de longitude, em colaboração dos profissionais da Associação Brasileira dos Criadores de Girolando -GIROLANDO. O total de 88 reprodutores foram manejados extensivamente em piquetes de *Urochloa brizantha*, com sal mineral e água fornecidos *ad libitum*. Submetidos ao manejo sanitário e antiparasitário de acordo com manejo empregado na unidade.

2.2. Mensurações biométricas dos órgãos genitais

Após contenção individual dos animais em tronco de contenção apropriado (modelo Araçatuba), foram realizadas mensurações testiculares. As mensurações do comprimento e largura testicular foram obtidas com auxílio de paquímetro, sendo o comprimento mensurado no sentido mais longo da gônada (dorso-ventral), incluindo a cabeça e excluindo a cauda do epidídimo, e a largura, na região mais larga da gônada, no sentido latero-medial, utilizando como referência o corpo do animal. O perímetro escrotal foi obtido com auxílio de fita métrica,

após leve tracionamento ventro-caudal das gônadas e na região mais larga do escroto e a consistência testicular foi classificada de 1 (consistência firme) a 5 (consistência muito flácida). Posteriormente, realizou-se a palpação no intuito de verificar consistência, comprimento e largura das glândulas vesiculares (VASCONCELOS, 2001).

2.3. Coletas e avaliações dos ejaculados

Todos os touros foram submetidos a coleta de sêmen pelo método de eletroejaculação avaliando-se os aspectos físicos do ejaculado 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 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 100 x, sendo observados mínimos de quatro campos. 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 1000 x 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 acrossoma, 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, 2013). Após a avaliação andrológica, somente os touros aprovados foram submetidos ao teste de congelabilidade, sendo os demais descartados como reprodutores de forma definitiva, por tratar-se de um quadro espermático com índices elevados de patologias espermáticas ou alguma alteração adquirida e irreversível nos órgãos genitais, tais como calcificação testicular, assimetria testicular adquirida por atrofia, hidrocele.

2.4. Congelamento de sêmen e análise do sêmen pós-descongelamento

No total de 76 touros (76/88; 86,36 %) foram submetidos ao teste de congelabilidade do sêmen, sendo 41 touros 3/4 (Holandês x Gir) e 35 touros 5/8 com idade variando de 15 a 36 meses e peso corporal entre 400 a 600 kg.

Após a contenção em tronco apropriado e a higienização prepucial com três lavados com solução de Kiolol a 2 % (Quinabra®), os animais foram submetidos a coleta de sêmen pelo método de eletroejaculação. Após a coleta, avaliou-se os aspectos físicos do sêmen (turbilhonamento, motilidade espermática, vigor espermática (como descrito no item 2.3) e concentração espermática por mL e por ejaculado, sendo efetuado com auxílio de uma câmara de Neubauer e a diluição do sêmen na proporção de 1:100). Posteriormente, efetuou-se a diluição do sêmen em meio de congelamento (Botu-Bov®; Botupharma) de modo a obter uma concentração de 30×10^6 de espermatozoides por dose. Um total de 10 doses foram criopreservadas por touro.

Após a diluição, o sêmen diluído foi envasado em palhetas finas modelo francês (IMV®) e condicionadas na plataforma de congelamento da máquina de criopreservação (NEOVET MOD. CRYOGEN HSE®) e submetida a curva de resfriamento a $-0,7^\circ\text{C}$ por minuto e posterior estabilização por quatro horas a 4°C e posterior congelamento até -146°C . Posteriormente as palhetas foram raqueadas e estocadas em botijão de nitrogênio líquido a -196°C até o dia das análises.

As doses de sêmen foram descongeladas em água a 37°C por período mínimo de 20 segundos, sendo avaliado quanto a motilidade espermática e o vigor espermático com mesmo procedimento adotado para avaliação do sêmen pós coleta. As doses de sêmen foram consideradas aprovadas quanto se verificou no mínimo de 30 % de motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático de 3, de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

2.5. Avaliação ultrassonográfica

Para as análises ultrassonográficas foi utilizado o aparelho de ultrassom (modelo 2200, Mindray®), com transdutor linear transretal. Os animais foram submetidos a avaliações do parênquima testicular com o transdutor de frequência de 7,5 MHz, sendo realizada uma imagem de cada testículo no plano longitudinal-lateral, com a probe paralela ao eixo maior do testículo.

Os valores de escala de cinza foram determinados a partir das imagens ultrassonográficas do parênquima testicular. A amplitude total da escala de cinza foi definida por valores numéricos de 0 (zero) a 255, em que o valor 0 representou a cor preta (anecóica) e o valor 255 representou o branco (hiperecóica) (MANRIQUE AYALA, 2011). A avaliação das imagens foi realizada utilizando o software ImageJ versão 1.52a (National Institutes of Health, EUA). A média das escalas de cinza de cada testículo foi calculada a partir de cinco campos de

1264 pixels, selecionados aleatoriamente dentro do parênquima testicular (Figura 1). A escala de cinza por animal foi obtida pela média dos dois testículos.



FIGURA 1: Esquematização da seleção aleatória de cinco campos com área de 1264 pixels cada, no parênquima testicular de touros da raça Girolando.

2.6. Análises estatísticas

Para análise dos dados foi utilizado o *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett para verificação de normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Os dados de motilidade espermática foram submetidos à transformação angular ($Y' = \arcsen\sqrt{Y}$), os dados de defeitos espermáticos de cabeça e defeitos espermáticos menores foram submetidos à transformação inversa da raiz quadrada ($Y' = 1/\sqrt{Y + 0.5}$), e os dados de defeitos espermáticos de peça intermediária e defeitos espermáticos totais foram submetidos à transformação raiz quadrada ($Y' = \sqrt{Y + 0.5}$).

Os dados foram avaliados em modelos lineares mistos (*MIXED procedure*) com medidas repetidas no tempo (Littell et al., 2006) de acordo com o modelo:

$$Y = X\beta + Zv + e$$

Em que: ${}_nY_l$ é o vetor das observações; ${}_nX_{p+1}$ é a matriz de incidência dos efeitos fixos (grau de sangue e idade); ${}_p+1\beta_l$ é o vetor de efeitos fixos desconhecidos; ${}_nZ_q$ é a matriz de incidência dos efeitos aleatórios (coleta, valor genético da mãe e habilidade predita de transmissão do pai); ${}_qV_l$

é o vetor de efeitos aleatórios desconhecidos; ne_1 é o vetor de erros aleatórios. Em que n é o número de observações, p é o número de parâmetros e q é o número de efeitos aleatórios. Assumiu-se que os efeitos aleatórios e os erros tiveram distribuição normal com média zero e foram não correlacionados.

As relações entre as variáveis foram avaliadas pela correlação simples de Pearson (*CORR procedure*).

Os dados de vigor espermático e turbilhonamento (movimento em massa) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (*NPARIWAY procedure*). Os dados de aspecto seminal em cada grau de sangue foram arranjados em tabelas de contingência e analisados pelo teste de Freeman-Halton (*FREQ procedure*). O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

O efeito das variáveis em estudo sobre a probabilidade de aprovação do touro baseado na motilidade espermática pós-descongelamento ($\geq 30\%$) foi avaliado por regressão logística univariada (*LOGISTIC procedure*). As variáveis foram consideradas significativas quando $p < 0,10$. A associação entre as probabilidades preditas e as respostas observadas foi avaliada pela área sob a curva ROC (*receiver operator characteristic; c*; Hosmer e Lemeshow, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises dos parâmetros biométricos dos testículos e desenvolvimento corporal (tabela 1) não se observou nenhuma diferença entre os valores médios obtidos para os animais dos genótipos 3/4 e 5/8 Holandês x Gir ($p > 0,05$), demonstrando assim que não há influência do genótipo sobre o desenvolvimento das gônadas e desenvolvimento corporal. Desde modo, ao se avaliar as mensurações testiculares em animais da raça Girolando, se deve ter como referência os valores preconizados para animais das raças taurinas (CBRA, 2013).

Não havendo diferença entre os valores médios para ambos genótipos estudados, os dados biométricos foram analisados conjuntamente para avaliar seu comportamento em função da idade. Nas figuras 2, 3, 4, 5 e 6 são demonstrados os comportamentos dos parâmetros biométricos testiculares e de desenvolvimento corporal, onde se verificou para todos os parâmetros, o comportamento linear para o intervalo das faixas etárias avaliadas.

Em todos os parâmetros, exceto para o peso corporal, foi observado grande dispersão dos valores em relação a reta (com valores de R^2 entre 0,29 e 0,33), provavelmente em função do pequeno número de animais utilizados neste experimento, além dos estudos anteriores demonstrarem que o desenvolvimento gonadal e corporal ocorrerem até os seis ou sete anos de idade (PENITENTE-FILHO et al. 2018), de modo que no presente estudo, pequeno percentual de animais apresentaram idades próximas a seis anos.

TABELA 1: Peso corporal, biometrias testiculares, vesículas seminais e número de pixels em escala de cinza do parênquima testicular de touros da raça Girolando, de acordo com o grau de sangue 3/4 e 5/8 Holandês x Gir, criados em regime extensivo

Variáveis	3/4	5/8	P-valor
Peso corporal (kg)	611,1 ± 16,7	589,7 ± 17,1	0,3772
Perímetro escrotal (cm)	36,3 ± 0,5	37,1 ± 0,6	0,2612
Comprimento testicular (cm)	12,8 ± 0,2	13,3 ± 0,2	0,0596
Largura testicular (cm)	7,1 ± 0,1	7,2 ± 0,1	0,3398
Razão testicular ¹	0,555 ± 0,005	0,547 ± 0,006	0,2790
Volume testicular (cm ³)	701,2 ± 31,2	765,5 ± 32,4	0,1466
Escala de cinza	57,3 ± 1,8	61,1 ± 1,9	0,1260
Comp. Vesícula seminal (cm)	10,1 ± 0,2	9,9 ± 0,3	0,7623
Larg. Vesícula seminal (cm)	2,2 ± 0,05	2,1 ± 0,06	0,7450

¹ Razão entre largura e comprimento testiculares, Comp.: comprimento testicular; Larg.: largura testicular.

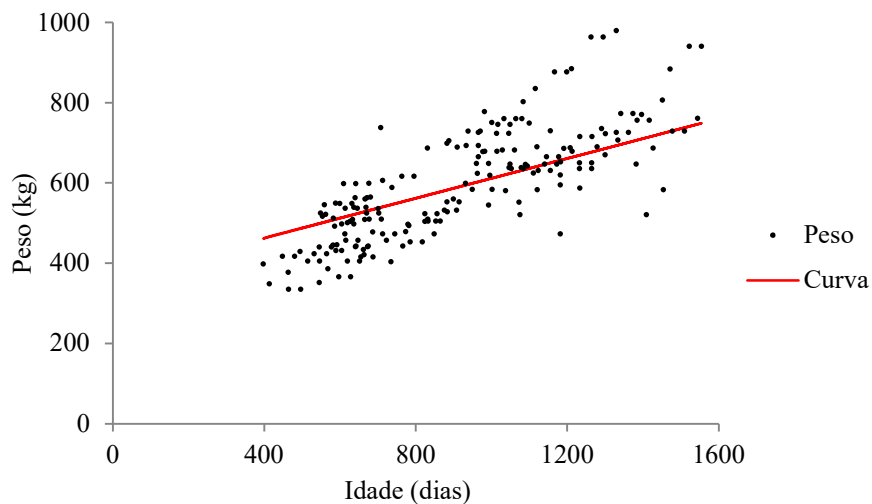


FIGURA 2: Peso corporal de touros da raça Girolando (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo

$$Peso = 363,58 + 0,2478 \times Idade; R^2 = 0,63; P < 0,0001$$

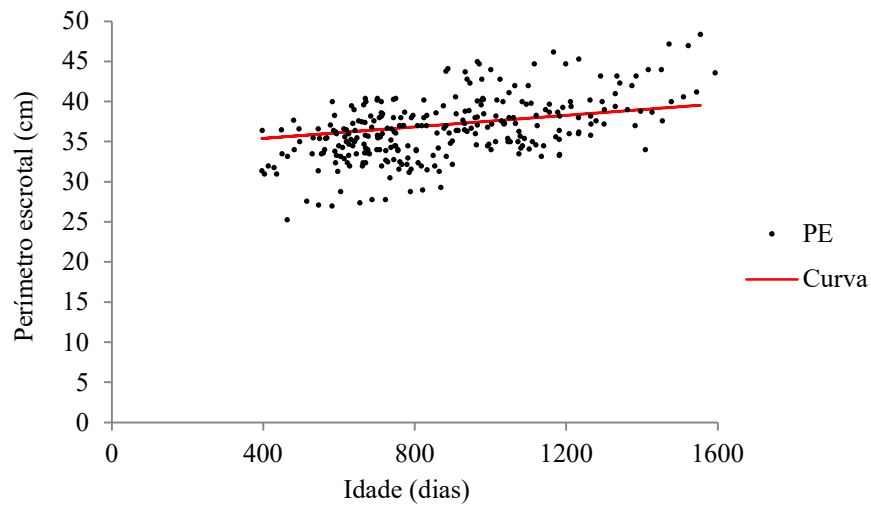


FIGURA 3: Perímetro escrotal (PE) de touros da raça Girolando (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo

$$PE = 33,9595 + 0,003604 \times Idade; R^2 = 0,31; P < 0,0001$$

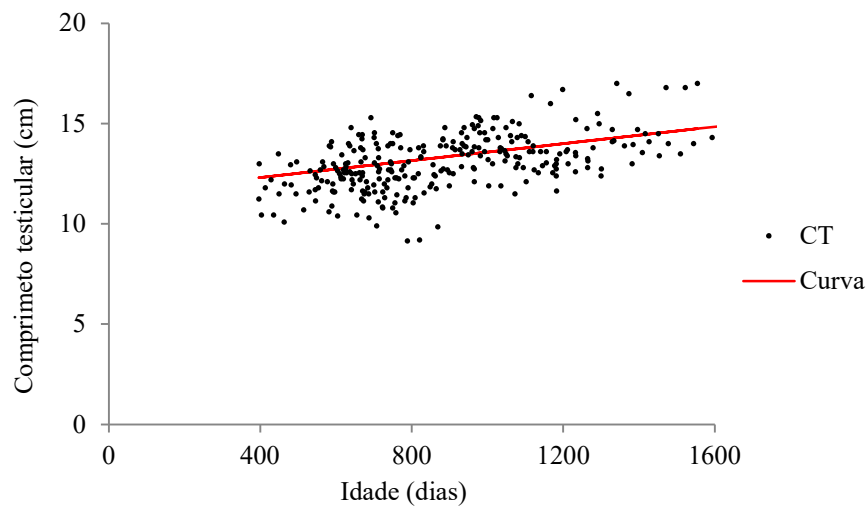


FIGURA 4: Comprimento testicular (CT) de touros da raça Girolando (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo

$$CT = 11,4618 + 0,00211 \times Idade; R^2 = 0,29; P < 0,0001$$

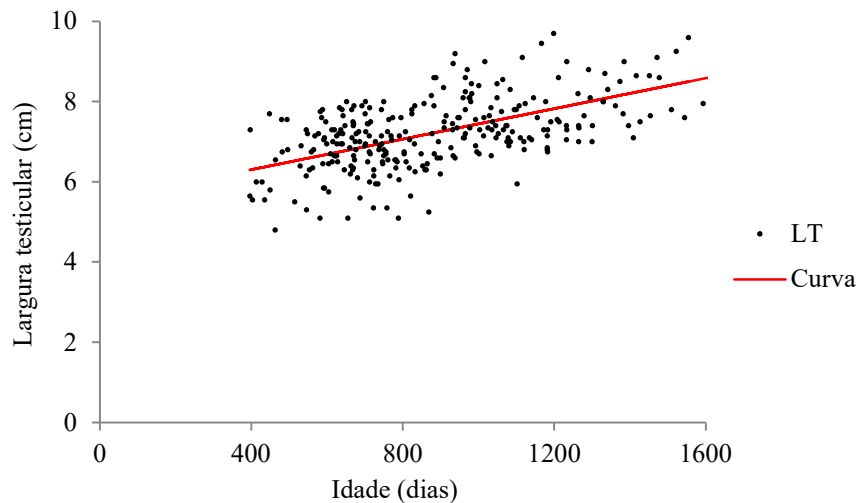


FIGURA 5: Largura testicular (LT) de touros da raça Girolando (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo

$$LT = 5,5409 + 0,0019 \times Idade; R^2 = 0,30; P < 0,0001$$

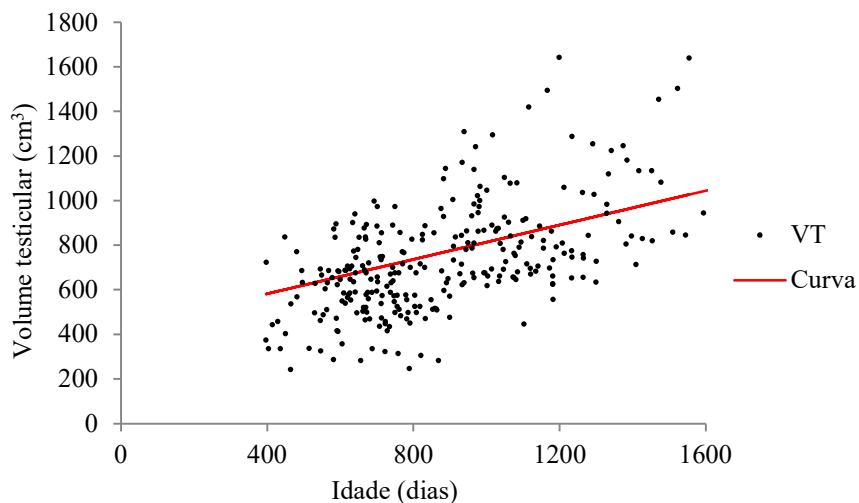


FIGURA 6: Volume testicular (VT) de touros da raça Girolando (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo

$$VT = 428,18 + 0,3852 \times Idade; R^2 = 0,33; P < 0,0001$$

Com relação as correlações entre parâmetros biométricos testiculares e de peso corporal, verificou-se os parâmetros biométricos estão altamente correlacionados entre si (tabela 2). Embora não tenham sido analisadas as correlações genéticas destes parâmetros, os valores obtidos de correlações de Person indicam que é possível a seleção para todos os parâmetros biométricos estudados, utilizando somente para a formação de banco de dados e seleção de um animal melhorador. Corroborando assim com os programas de Seleção de Reprodutores atuais,

no qual empregam o perímetro escrotal como parâmetro reprodutivo no modelo de avaliação (SCHMIDT et al., 2019).

No presente estudo, corroborando com estudos anteriores, não se verificou correlação da razão testicular e da ecogenicidade testicular com os demais parâmetros biométricos testicular (PINHO et al. 2013) e corporal avaliados (tabela 2), sendo o primeiro relacionado principalmente largura testicular e o segundo relacionado ao grau de maturidade sexual.

TABELA 2: Correlações Simples de Pearson das características biométricas e escala de cinza do parênquima testicular de touros da raça Girolando, acordo com o grau de sangue (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo

Variáveis	PC	PE	CT	LT	VT	RT	ECPT
PC	1	0,71	0,70	0,68	0,73	0,16	-0,03
PE		1	0,82	0,91	0,91	0,33	-0,06
CT			1	0,80	0,89	-0,12	0,04
LT				1	0,97	0,50	-0,06
VT					1	0,31	-0,02
RT						1	-0,16
ECPT							1

P < 0,05; PC: peso corporal em kg; PE: perímetro escrotal em cm; CT: comprimento testicular em cm; LT: largura testicular em cm; VT: volume testicular em cm³; RT: razão testicular (LT/CT); ECPT: escala de cinza do parênquima testicular.

Nas análises dos parâmetros físicos do sêmen fresco e pós-descongelamento (tabela 3), não se verificou diferenças entre os valores médios obtidos nos ejaculados dos animais 3/4 e 5/8 Holandês x Gir ($p > 0,05$). Ao se avaliar o comportamento da motilidade espermática em relação a idade dos animais, verificou-se o comportamento linear (figura 7) porém com grande dispersão dos valores obtidos, provavelmente em função no número de animais avaliados e da permanência de touros classificados como inaptos a reprodução permanecerem nas análises até o último exame.

TABELA 3: Características físicas e morfológicas do sêmen de touros da raça Girolando, de acordo com o grau de sangue ¾ e 5/8 Holandês x Gir, criados em regime extensivo

Variáveis	¾	5/8	P-valor
Volume (ml)	4,4 ± 0,2	4,1 ± 0,2	0,2546
Motilidade (%)	68,4 ± 2,0	72,5 ± 1,9	0,4080
Vigor ¹	3,0 (3,0 – 3,5)	3,0 (3,0 – 3,5)	0,5569
Turbilhonamento ¹	1,0 (0,0 – 2,0)	1,0 (0,0 – 2,0)	0,9543
Motilidade pós cong, (%)	40,0 ± 1,2	35,8 ± 1,1	0,2387
Defeitos maiores (%)	30,3 ± 3,5	20,0 ± 3,8	0,0465
Defeitos menores (%)	4,8 ± 0,8	4,6 ± 0,4	0,7537
Defeitos totais (%)	33,3 ± 2,3	23,4 ± 2,1	0,0282
Defeitos de acrossoma (%)	6,1 ± 0,9	5,1 ± 1,0	0,3998
Defeitos de cabeça (%)	6,0 ± 0,9	4,0 ± 0,7	0,0195
Defeitos de PI (%)	2,1 ± 0,31	1,5 ± 0,27	0,1144
Defeitos de cauda (%)	7,7 ± 0,7	6,0 ± 0,7	0,0824
Gota proximal (%)	3,7 ± 0,8	2,9 ± 0,9	0,4992

¹ Mediana (primeiro e terceiro quartis), teste de Kruskal-Wallis, cong.: congelamento; PI: peça intermediária.

Com relação aos aspectos do sêmen, foram registrados a maior frequência de ejaculados com aspectos leitoso, seguidos pelos aspectos opalescentes, aquoso e cremoso (Figura 8). Ressalta-se que ejaculados que apresentaram aspectos aquoso e opalescentes não foram submetidos ao processo de congelamento, por não apresentarem concentrações espermáticas que permitisse diluição ao meio de congelamento na proporção acima de 1 para 3 (1 de sêmen: 2 de diluente) e uma concentração final de 30×10^6 espermatozoides por dose.

No entanto foi verificada diferença nos aspectos morfológicos do sêmen, onde o percentual de defeitos espermáticos maiores e totais se mostram maior em ejaculados obtidos de touros ¾ Holandês x Gir (tabela 3). Porém, os valores se encontravam nos limites inferiores aceitáveis para touros aptos à reprodução, tal como preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). Entre as anomalias espermáticas, os defeitos de cabeça foram os mais frequentes nos ejaculados, e as demais anomalias espermáticas analisadas estavam presentes em percentuais baixos e não diferiram entre os grupamentos genéticos estudados ($p > 0,05$). Os defeitos espermáticos maiores apresentaram comportamento linear inverso em função da idade (figura 9), com redução para índices aceitáveis para touros aprovados em exames andrológicos. O grande grau de dispersão dos valores percentuais obtidos por touros se

deveu a presença consecutiva de touros classificados como inaptos a reprodução e que até a última avaliação andrológica do presente estudo, os mesmos se encontravam ainda inaptos a reprodução, apresentando elevados percentuais de anomalias espermáticas. Assim é esperado que com o avançar da idade, as anomalias espermáticas caiam para valores baixos ou inexistam (Guimarães, 1993, 1997).

Os aspectos físicos e morfológicos do sêmen apresentaram baixas ou moderadas correlações simples de Person com as características biométricas testiculares, corporais e ecogenicidade do parênquima testicular (tabela 4). Estas observações ressaltam a importância dos exames andrológicos na predição do potencial reprodutivo dos reprodutores (BARTH, 2018), de modo que valores elevados para biometrias testiculares e corporal não foram garantias de qualidade seminal no presente estudo em touros da raça Girolando, independente do grau de sangue $\frac{3}{4}$ ou $\frac{5}{8}$ Holandês x Gir.

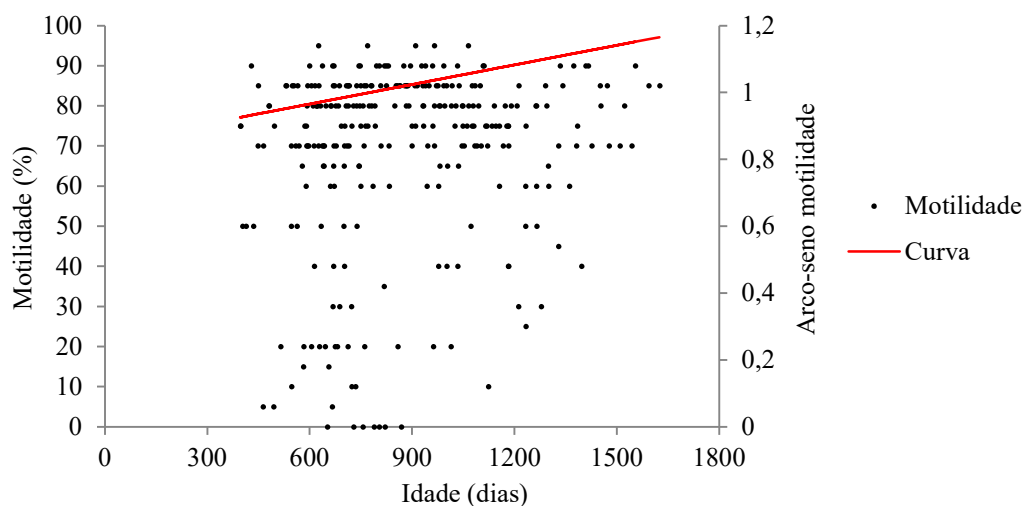


FIGURA 7: Motilidade espermática progressiva e retilínea (%) em sêmen fresco de touros da raça Girolando (grau de sangue $\frac{3}{4}$ e $\frac{5}{8}$ Holandês x Gir), criados em regime extensivo
 $Arcsen(\sqrt{Motilidade}) = 0,8483 + 0,000195 \times Idade$; $P < 0,0340$; $R^2 = 0,01$

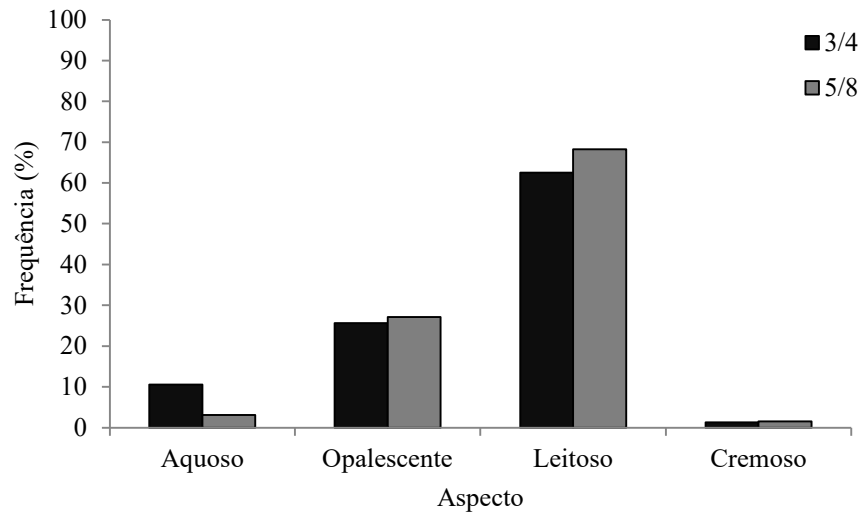


FIGURA 8: Aspectos físicos do sêmen de touros da raça Girolando, acordo com o grau de sangue (3/4 ou 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo; ($P = 0,0982$) pelo teste de Freeman-Halton

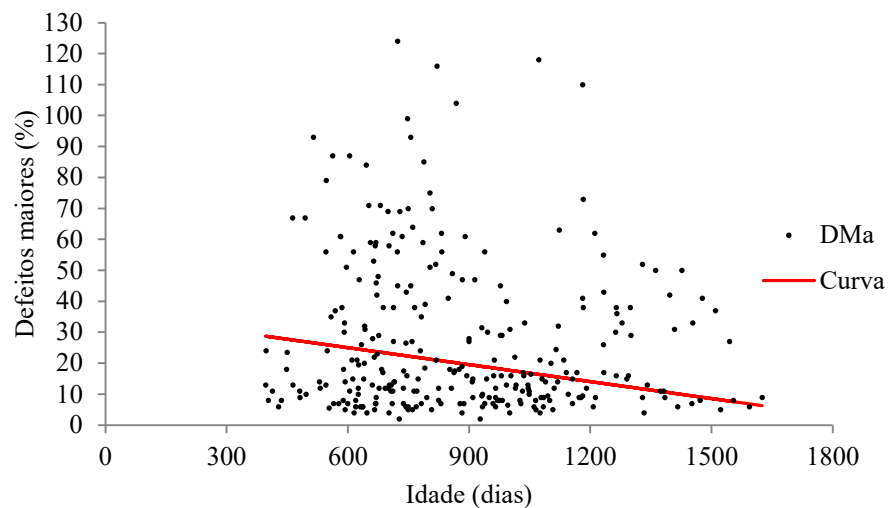


FIGURA 9: Defeitos espermáticos maiores (% DMA) de touros da raça Girolando (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo

$$DMA = 35,9603 - 0,01827 \times Idade; P < 0,0233; R^2 = 0,01$$

TABELA 4: Coeficientes de correlação simples de Pearson das características biométricas, escala de cinza do parênquima testicular e parâmetros seminais de touros da raça Girolando, acordo com o grau de sangue (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo

Variáveis	PC	PE	CT	LT	VT	RT	EC
Vol	0,19	0,13	0,11	0,13	0,12	0,07	-0,10
Mot	0,24	0,36	0,39	0,36	0,35	0,05	0,06
DMA	-0,29	-0,43	-0,44	-0,41	-0,41	-0,04	0,00
DMe	0,02	0,02	-0,04	0,07	0,04	0,15	-0,04
Acr	-0,26	-0,35	-0,35	-0,33	-0,35	-0,04	0,00
Cab	-0,20	-0,25	-0,27	-0,21	-0,23	0,05	-0,02
PI	-0,20	-0,37	-0,36	-0,37	-0,33	-0,10	-0,02
Cau	-0,10	-0,17	-0,21	-0,16	-0,17	0,03	-0,07
Pro	-0,14	-0,25	-0,22	-0,22	-0,22	-0,05	0,01
Mot C	0,27	0,29	0,06	0,25	0,19	0,28	-0,20

Em negrito $p < 0,05$; PC: peso corporal (kg); PE: perímetro escrotal (cm); CT: comprimento testicular (cm); LT: largura testicular (cm); VT: volume testicular (cm^3); RT: razão testicular (LT/CT); EC: escala de cinza; Vol: volume de sêmen (mL); Mot: motilidade espermática (%); DMA: defeitos maiores (%); DMe: defeitos menores (%); Acr: defeitos de acrossoma (%); Cab: defeitos de cabeça (%); PI: defeitos de peça intermediária (%); Cau: defeitos de cauda (%); Pro: gota citoplasmática proximal (%); MotC: motilidade pós congelamento (%).

Do total de touros avaliados nos exames andrológicos, 76 foram submetidos ao teste de congelabilidade do sêmen (76/88; 86,36 %) e destes, 63 animais foram aprovados (63/76; 82,89 %), indicando assim que o exame andrológico é uma ferramenta determinante na seleção de doadores de sêmen, como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução (CBRA, 2013).

No presente estudo, quando os dados obtidos foram avaliados por análise de regressão logística, verificou que outros parâmetros mostraram-se eficazes na seleção dos potenciais doadores de sêmen, tais como o valor genético das mães, idade dos animais e a escala de cinza ou ecogenicidade do parênquima testicular (tabela 5).

A ecogenicidade, quando analisada em termos de probabilidade de congelamento do sêmen avaliada com motilidade espermática progressiva retilínea com valores superiores a 30 %, se mostrou eficaz em demonstrar que animais com maior número de pixels ao exame ultrassonográfico (maior ecogenicidade) tiveram menor probabilidade de congelamento do sêmen (figura 10), embora este parâmetro tenha apresentado baixa ou nula correlação com a motilidade espermática pós-descongelamento (tabela 4), provavelmente pelo fato de pouca variação na motilidade pós-descongelamento. Este comportamento também foi observado para os parâmetros biométricos testiculares e formato testicular (tabela 4).

TABELA 5: Estimativas de máxima verossimilhança e área sob a curva ROC (c) da análise de regressão logística univariada usada para prever a probabilidade de aprovação por motilidade espermática ($\geq 30\%$) no teste de congelamento de sêmen de touros da raça Girolando, criados em regime extensivo

Variável	n	β_0	β_1	p -valor	c
Escala de cinza	108	5,3900	-0,0525	0,0444	0,690
Idade (dias)	148	4,7603	-0,00230	0,0390	0,656
Defeitos maiores	148	3,3560	-0,0358	0,0082	0,754
Valor genético da mãe	135	-0,3182	0,00516	0,0029	0,921

N: número de observações utilizadas na análise; c : área sob a curva ROC (*receiver operator characteristic*).

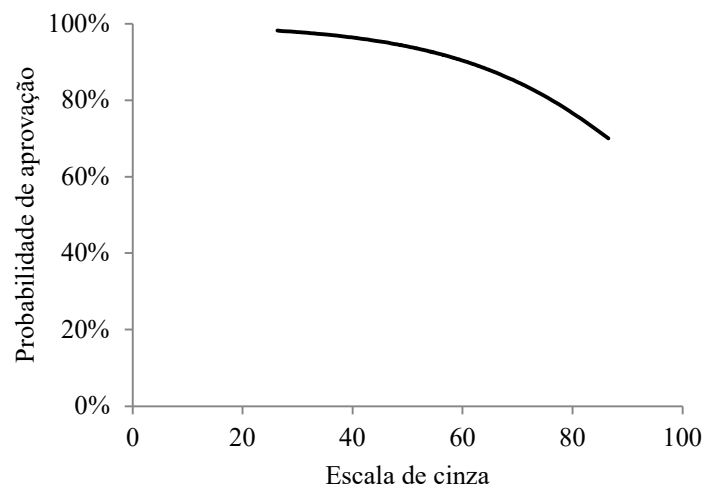


FIGURA 10: Probabilidade de aprovação por motilidade espermática ($\geq 30\%$) no teste de congelamento de acordo com a escala de cinza do parênquima testicular (ECPT) de touros da raça Girolando (3/4 e 5/8 Holandês x Gir), criados em regime extensivo, $P = \frac{e^{(5,39-0,0525 \times EC)}}{1+e^{(5,39-0,0525 \times EC)}}$,

4. CONCLUSÃO

- Animais da raça Girolando apresentam precocidade sexual compatíveis aos animais das raças taurinas, apresentando qualidade seminal e excelente congelabilidade do sêmen;
- Após a maturidade sexual o grau de sangue na composição racial (3/4 ou 5/8 Holandês/Gir, respectivamente) não influencia na qualidade seminal ou na congelabilidade do sêmen de reprodutores doadores;
- Características seminais físicos e morfológicos são parâmetros mensuráveis e correlacionados a congelabilidade do sêmen de fácil emprego e determinate na seleção de reprodutores para uso em programa de melhoramento genético em bovinos da raça Girolando;

- A diluição do sêmen ao diluente de congelamento na proporção de 1:3 (1 parte de sêmen e 2 partes de diluente) proporciona elevado índice de sucesso no congelamento de sêmen de reprodutores da raça Girolando;

- O exame andrológico mantém-se como a melhor ferramenta na avaliação e seleção de doadores de sêmen.

5. REFERÊNCIAS

BARTH, A.D. Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. **Animal**. 2018. doi: 10.1017/S1751731118000538

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v.25, p.383-391, 1973.

BRUSCHI, J. H. Escolha do reprodutor (EMBRAPA-CNPGL. Comunicado Técnico, (11). Coronel Pacheco: **Embrapa Gado de Leite-Documentos**, 1996.

CANAZA-CAYO, A.W.; LOPES, P.S.; DA SILVA, M.V.G.B.; COBUCI, J.A.; DE ALMEIDA TORRES, R.; MARTINS, M.F.; ARBEX, W.A. Estrutura populacional da raça Girolando. **Ciência Rural**, v.44(11), p.2072-2077, 2014.

COLLIER, R.J.; DAHL, G.E.; VANBAALE, M.J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of dairy science**, v.89(4), p.1244-1253, 2006.

DAS, R.; SAILO, L.; VERMA, N.; BHARTI, P.; SAIKIA, J. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. **Veterinary world**, v.9(3), p.260-268, 2016.

EMBRAPA GADO DE LEITE, Sistemas de Produção de Leite (Zona da mata Atlântica), ISSN 1678-314X Versão eletrônica, Jan./2003

FACÓ, O.; LÔBO, R.N.B.; MARTINS FILHO, R.; MOURA, A.D.A.A. Análise do desempenho produtivo de diversos grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.1944-1952, 2002.

FAÇANHA, D.A.E.; CHAVES, D.F.; MORAIS, J.H.G.; VASCONCELOS, Â.M.D.; COSTA, W.P.; GUILHERMINO, M.M. Tendências metodológicas para avaliação da adaptabilidade ao ambiente tropical. **Revista brasileira de saúde e produção animal**, v.14(1), p.91-103, 2013.

GONÇALVES, G.S.; CEMBRANELLI, M. de A.R.; PAIVA, L. de C.; SILVA, M.V.G.B.; MARTINS, M.F.; PANETTO, J.C. do C.; FERREIRA JÚNIOR, E.; MACHADO, M.A.; REIS, D.R. de L. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando 7ª Prova de Pré-Seleção de Touros Maio 2019. **Embrapa Gado de Leite-Documentos (INFOTECA-E)**, 2019

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v.76, p.84-97, 1957.

KASTELIC, J.P.; BRITO, L.F.C. Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. **Reproduction in domestic animals**, v.47, p.45-51, 2012.

LIMA, I.D.A.; AZEVEDO, M.D.; BORGES, C.R.D.A.; FERREIRA, M.D.A.; GUIM, A.; ALMEIDA, G.L.P.D. Thermoregulation of Girolando cows during summertime, in Pernambuco State, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.35(2), p.193-199, 2013.

SCHMIDT, P.I.; CAMPOS, G.S.; ROSO, V.M.; SOUZA, F.R.P.; BOLIGON, A.A. Genetic analysis of female reproductive efficiency, scrotal circumference and growth traits in Nelore cattle. **Theriogenology**, v.128, p.47-53, 2019.

SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; GONÇALVES, G. S.; PANETTO, J. C. do C.; PAIVA, L. DE C.; MACHADO, M. A.; REIS, D. R. de L.; FERREIRA JUNIOR, E.; CEMBRANELLI, M. DE A. R. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando. Sumário de Touros. Resultado do Teste de Progênie. Junho 2019, **Embrapa Gado de Leite- Documentos (INFOTECA-E)**, 2019.

PINHO, R. O., COSTA, D. S., SIQUEIRA, J. B., MARTINS, L. F., TEIXEIRA, L. A., GUIMARÃES, S. E.F., GUIMARÃES, J.D. Lack of relationship between testicular echotexture and breeding soundness evaluation in adult Nelore bulls, **Livestock Science**, v.154, p.246-249, 2013.

Anexo 1. Caracterização geral de proteínas do plasma seminal de Touros Nelore.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	PI	Peptide sequence	Protein identification probability	Best Peptide identification probability	Sequence coverage FASTA
Clusterin	CLUS_BOVIN	51114,70	5.73	ASSIMDELFQDRFFLR	100,00%	97,90%	31,89%
				CQEILEVDCSASNPTQTLLR	100,00%	99,70%	
				GSLFFNPK	100,00%	99,70%	
				IDSLMENDR	100,00%	99,70%	
				KLLSSLEEAK	100,00%	99,70%	
				LYDQLLQSYQQK	100,00%	99,70%	
				RPQDTQYYSPFSSFPR	100,00%	99,70%	
				TQIEQTNEER	100,00%	99,70%	
				LFNSFPITVTVPQEVSSPNFMENVAEK	100,00%	99,70%	
ELQEMSTEGSK	100,00%	97,20%					
Spermadhesin-1	SPAD1_BOVIN	15036,60	5.07	ICEGSLMDYR	100,00%	99,70%	80,60%
				NTNCGGILKEESGVIATYYGPK	100,00%	99,70%	
				SSGSIMTVK	100,00%	99,70%	
				TNCVWTIQMPPEYHVR	100,00%	99,70%	
				VSIQYLQLNCNKESLEIIDGLPGSPVLGK	100,00%	99,70%	
				YIREPEHPASFYEVLYFQDPQA	100,00%	99,70%	
Seminal ribonuclease	RNS_BOVIN	16376,60	9.32	CKPVNTFVHESLADVK	100,00%	99,40%	48,00%
				ETGSSKYPNCAYK	100,00%	99,70%	
				HIIVACGGKPSVPVHFDASV	100,00%	98,70%	

				QHMDSGNSPSSSSNYCNLMMCCR	100,00%	99,70%	
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2_BOVIN	24355,23	7.44	EVDSGNDIYGNPIKR	100,00%	99,70%	40,45%
				FFACIKR	100,00%	99,70%	
				GAAPPKQEFLDIEDP	100,00%	94,60%	
				IQYEIK	100,00%	96,40%	
				KEYLIAGK	100,00%	97,90%	
				RSDGSCAWYR	100,00%	98,70%	
				GPDQDIEFIYTAPSSAVCGVSLDIGGKK	100,00%	99,70%	
Plasma serine protease inhibitor	IPSP_BOVIN	45296,80	9.40	AKWETSFNLK	100,00%	99,60%	38,12%
				AQILEGLGIGPGEGSEEELHSASQR	100,00%	99,70%	
				DFVFDLYR	100,00%	99,60%	
				ELQQPQDSLQLSLGNALFTKPR	100,00%	99,70%	
				GKIVDLIK	100,00%	99,50%	
				HILFLGK	100,00%	98,20%	
				INDYVAK	100,00%	97,00%	
				LPIQEAFLGAMR	100,00%	99,70%	
				QQDQFYLLDR	100,00%	99,70%	
				RLELYLPK	100,00%	97,40%	
				STHEQDFYVTPETVVR	100,00%	99,70%	
				TLYLADTFPTNFEDPEGAKK	100,00%	99,30%	
Seminal plasma protein A3	SFP3_BOVIN	16141,20	4.90	KDPASGAETK	100,00%	97,90%	23,57%
				CVFPPFIYEGK	100,00%	99,40%	
				DNKCVFPIYGNK	100,00%	99,30%	

Platelet-activating factor acetylhydrolase	PAFA_BOVIN	50137,19	6.12	ASLAFLQK	100,00%	99,50%	32,88%
				DGSACSTYYFK	100,00%	99,70%	
				EYFLGLSK	100,00%	99,70%	
				FLGTHWLVGK	100,00%	99,30%	
				FQYPSNIIR	100,00%	98,10%	
				GSVHQNFVDFTFATSK	100,00%	99,70%	
				IAIIGHSFGGATVIQTLSEDQR	100,00%	99,00%	
				IIGYLFTLK	100,00%	99,60%	
				IPQPLFFINER	100,00%	99,70%	
				IQALMAAANIGQSK	100,00%	99,70%	
				RGEEEFPLR	100,00%	99,20%	
				TGEKYPLIIFSHGLGAFR	100,00%	99,10%	
				NPC intracellular cholesterol transporter 2	NPC2_BOVIN	16639,90	
EVNVSPCPTQPCK	100,00%	99,70%					
FKDCGSWVGVIK	100,00%	99,60%					
DKTYNYVVK	100,00%	99,50%					
LPVKNEYPSIK	100,00%	99,70%					
VVVEWELTDDKNQR	100,00%	99,70%					
Spermadhesin 2	Q4R0H2_BOVIN	15221,20	5.92				DVHLNCNKESLEIIEGPPSSNSR
				ILLEVR	100,00%	99,70%	
				KPNHPAPDFLIFR	100,00%	99,70%	
				MDPGYR	100,00%	96,40%	
Complement C3	CO3_BOVIN	187253,19	6.41	AAVYNHFISDGVKK	100,00%	95,90%	25,23%
				ACEPGVDYVYK	100,00%	95,80%	
				AFLDCCEYITQLR	100,00%	99,70%	

AILYNYR	100,00%	97,00%
DICEAQVNSLGR	100,00%	99,70%
DPLTITVR	100,00%	99,70%
DYDTTPPVVR	100,00%	97,60%
FYYIDDPDGLK	100,00%	97,30%
HIPVVTQGSNVQSLTQDDGVAK	100,00%	99,70%
HQQTITIPAR	100,00%	99,70%
IGLHEVEVK	100,00%	99,20%
ILWESASLLR	100,00%	97,10%
ISLTHSLTR	100,00%	99,70%
ISYIIGK	100,00%	99,70%
KGYTQQLAFR	100,00%	98,90%
KIWDVVEK	100,00%	98,60%
LLPVGQTVFITIETPDGIPVKR	100,00%	98,90%
LMNVFLK	100,00%	96,30%
LPYSVVR	100,00%	97,60%
LVAYYTLINAK	100,00%	99,70%
NYAGVFTDAGLTLK	100,00%	95,90%
QVLLNGVQPSR	100,00%	99,70%
RQESLELIR	100,00%	99,70%
SSVAVPYVIVPLK	100,00%	97,20%
TGIPIVTSPIYQIHFTK	100,00%	99,70%
TIYTPGSTVLYR	100,00%	98,90%
TLNPEHLGQGGVQR	100,00%	98,30%
VELKPGETLNVNFHLR	100,00%	98,50%
VELLYNPAFCSLATAK	100,00%	99,70%

				VGLVAVDK	100,00%	99,70%	
				VHQYFNVGLIQPGAVK	100,00%	98,40%	
				VPINDGNGEAILKR	100,00%	99,70%	
				VSHTVEDCLSFK	100,00%	99,70%	
				VSIRPAPETVK	100,00%	97,40%	
				VYSYYNLDETCIR	100,00%	99,70%	
				WLILEK	100,00%	96,30%	
Serum albumin	ALBU_BOVIN	69293,41	5.82	AEFVEVTK	100,00%	97,30%	50,91%
				CCAADDKEACFAVEGPK	100,00%	99,70%	
				CCTESLVNR	100,00%	99,70%	
				DAFLGSFLYEYSR	100,00%	99,70%	
				DDPHACYSTVFDKLLK	100,00%	97,10%	
				EYEATLEECCA	100,00%	98,10%	
				FKDLGEEHFK	100,00%	99,70%	
				HLVDEPQNLIK	100,00%	99,70%	
				KQTALVELLK	100,00%	99,70%	
				KVPQVSTPTLVEVSR	100,00%	99,70%	
				LCVLHEKTPVSEK	100,00%	99,70%	
				LFTFHADICTLPDTEK	100,00%	99,70%	
				LGEYGFQNALIVR	100,00%	99,70%	
				LKECCDKPLLEK	100,00%	99,70%	
				LKPDPN TLCDEFKADEK	100,00%	99,70%	
				LVNELTEFAK	100,00%	99,70%	
				LVTDLTK	100,00%	99,50%	
				MPCTEDYLSLILNR	100,00%	99,70%	
				RHPEYAVSVLLR	100,00%	99,70%	

				RHPYFYAPELLYYANK	100,00%	99,20%	
				RPCFSALTPDETYVPK	100,00%	99,10%	
				SLHTLFGDELCK	100,00%	99,70%	
				YICDNQDTISSK	100,00%	99,70%	
				TVMENFVAFVDK	100,00%	99,70%	
				LSQKFPK	100,00%	99,50%	
Serine protease inhibitor clade E member 2	Q8HZY1_BOVIN	43877,12	9.56	AKIEVSEDGTK	100,00%	99,60%	26,45%
				ASAATTAILIAR	100,00%	99,70%	
				DVFQCEVR	100,00%	99,50%	
				FTAVAQTDLKEPLK	100,00%	99,70%	
				LVLVNAVYFK	100,00%	99,70%	
				MEVPFVTR	100,00%	99,70%	
				NKDVFQCEVR	100,00%	99,40%	
				RVQVILPK	100,00%	99,60%	
				SENLHVSHILQK	100,00%	99,70%	
				VLGITDMFDPSK	100,00%	99,70%	
Sulfhydryl oxidase	A6QQA8_BOVIN	62975,17	9.26	AKAQEVLQAIR	100,00%	96,30%	33,86%
				DFNIPGFPTVR	100,00%	97,40%	
				FFFGCR	100,00%	96,90%	
				FGVTNFPSCYLLSR	100,00%	99,10%	
				FSVLEGQR	100,00%	99,50%	
				IPYGFFK	100,00%	99,10%	
				LAGAPSEDQPFPK	100,00%	97,60%	
				LEEITGFFAR	100,00%	99,70%	
				SALYSSSDPLTLLR	100,00%	99,70%	
				SFYTTYLR	100,00%	99,60%	

				TGSGTTLSVAGADVQTLR	100,00%	99,70%	
				THFSPSNIVLDFPSAGPGPWR	100,00%	98,90%	
				VNWVGCQGSEPHFR	100,00%	99,70%	
				GTPVWDLDNILK	100,00%	96,50%	
				VGSLNSAVLWFWSSHNK	100,00%	97,20%	
				VPALTESR	100,00%	99,40%	
Spermadhesin Z13	Z13_BOVIN	13383,90	5.58	DSTDGLLVKDK	100,00%	99,70%	30,17%
				DVHENCNKESLEIIEGPPSSNSR	100,00%	94,60%	
Lactotransferrin	TRFL_BOVIN	78057,00	8.69	AFALECIR	100,00%	99,70%	41,24%
				ANEGLTWNSLK	100,00%	99,70%	
				APVDAFKECHLAQVPSHAVVAR	100,00%	99,70%	
				CLQDGAGDVAFVK	100,00%	99,60%	
				DSALGFLR	100,00%	99,70%	
				EPYFGYSGAFK	100,00%	99,70%	
				ESPQTHYYAVAVVKK	100,00%	99,70%	
				ETTVFENLPEK	100,00%	99,70%	
				FFSASCVPCIDR	100,00%	99,70%	
				GEADALNLDGGYIYTAGK	100,00%	99,70%	
				IPSKVDSALYLGSR	100,00%	99,70%	
				KGSNFQLDQLQGR	100,00%	99,50%	
				LCALCAGDDQGLDK	100,00%	99,70%	
				LGAPSITCVR	100,00%	96,70%	
				LGGRPTYEEYLGTEYVTAIANLKK	100,00%	99,70%	
				LLCLDGTR	100,00%	97,50%	
				LRPVAAEIYGTK	100,00%	99,50%	
				NLLFNDNTECLAK	100,00%	99,30%	

				SFQLFGSPPGQR	100,00%	99,70%	
				SVDGKEDLIWK	100,00%	95,80%	
				VDSALYLGSR	100,00%	99,70%	
				VVWCAVGPPEEQKK	100,00%	98,30%	
				YYGYTGAFR	100,00%	96,80%	
Uncharacterized protein	A0A3Q1M858_BOVIN	19569,00	8.49	AVEQGLSVSNVQLLTK	100,00%	99,70%	26,11%
				EVIVVATDYK	100,00%	99,70%	
				FKIPLESGGK	100,00%	99,20%	
				TYAIMNILNR	100,00%	99,70%	
Angiotensin-converting enzyme	F1MQJ0_BOVIN	150100,80	5.90	ENYNQEWWSLR	100,00%	99,70%	11,26%
				FHIPASVPYVR	100,00%	94,60%	
				LEGPFGVSGR	100,00%	99,70%	
				LEPDLTNLMATSR	100,00%	99,70%	
				LKYQGVCPLAR	100,00%	99,70%	
				LNGYQDGGDSWR	100,00%	99,50%	
				NYQDLAWAWK	100,00%	98,00%	
				QGWTPLR	100,00%	97,00%	
				SILPYFPK	100,00%	98,80%	
				SQDDFDPGAK	100,00%	97,20%	
				VFDGSVTR	100,00%	99,70%	
				VNFLGLNLEEQQAR	100,00%	98,70%	
				YVELTNK	100,00%	99,20%	
				LGWPQYNWTPNSAR	100,00%	98,00%	
Complement factor H	CFAH_BOVIN	140372,40	6.43	CQAYYELR	100,00%	96,20%	20,31%
				EAFTMIGPR	100,00%	99,70%	
				ENYLIQDAEEIVCK	100,00%	98,20%	

				IENGFLSESTFTYPLNK	100,00%	99,70%	
				IQCVDGEWTALPVCIEEER	100,00%	99,70%	
				ISILCK	100,00%	97,30%	
				KGFFPEIR	100,00%	99,70%	
				QIHCSAGGVWSAETPK	100,00%	98,90%	
				SGEQVAFK	100,00%	99,70%	
				SGWTPAPTCIEITCDPPR	100,00%	99,40%	
				TPVILNGQAVLPK	100,00%	94,70%	
				TSGLITCLK	100,00%	99,70%	
				TTGSIVCGQDGWSDK	100,00%	99,70%	
				WVSLHPSR	100,00%	99,10%	
				YLQGETVR	100,00%	99,50%	
				FITCISGEWTQPPQCIATDELK	100,00%	94,80%	
				LNDRLDYECVDGYENR	100,00%	99,30%	
				LYYSYR	100,00%	95,20%	
				SWDHLTCTAEGWSPEEPCLR	100,00%	98,80%	
				TLGSIVMMCR	100,00%	97,80%	
Carboxylic ester hydrolase	E1BN79_BOVIN	64341,20	5.83	AIMESGVAIIPYLK	100,00%	99,70%	21,88%
				ELLSINQK	100,00%	99,20%	
				FVFGGAFLK	100,00%	97,00%	
				GLPLWPAYR	100,00%	94,80%	
				HSLVDIR	100,00%	97,90%	
				LGIFGFFNTGDEHAR	100,00%	99,70%	
				LKELELK	100,00%	99,20%	
				VSEDCLYLNİYAPAHAETGSK	100,00%	95,30%	
				VVDGLFFPNEPLDLLAQK	100,00%	99,60%	

				GNIVMFEEATEEEKGLSR	100,00%	95,50%	
Uncharacterized protein	E1BLI4_BOVIN	14167,70	9.35	CTWTILLER	100,00%	99,70%	23,20%
				FCSGGHLVFR	100,00%	99,70%	
				ISSYSSWEPK	100,00%	99,70%	
C-type natriuretic peptide	ANFC_BOVIN	13292,20	10.13	GCFGLKLDLDR	100,00%	99,70%	31,75%
				TPGGGGANLKDDR	100,00%	99,70%	
				TPSGEEVAEPQAAGGGQK	100,00%	99,70%	
Seminal plasma protein PDC-109	SFP1_BOVIN	15480,60	4.91	CVFPPFIYGGKK	100,00%	94,90%	40,30%
				IGSMWMSWCSLSPNYDKDR	100,00%	99,70%	
				KHFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR	100,00%	99,30%	
Beta-mannosidase	MANBA_BOVIN	101176,43	6.52	AGESVLLYTKPVPELLK	100,00%	99,70%	20,71%
				AVNIIIEVR	100,00%	99,70%	
				FNNLDYR	100,00%	99,30%	
				FQSPVVYANQR	100,00%	99,70%	
				GSNWIPADSFQDR	100,00%	94,90%	
				IESSFDVVSSK	100,00%	95,00%	
				IHKDPYR	100,00%	99,70%	
				INGLPIFLK	100,00%	99,70%	
				SSFALHR	100,00%	99,70%	
				TSAVAPFVWLDVGSIPGR	100,00%	99,70%	
				TVFFYPWKPTSK	100,00%	97,30%	
				VSSEEDWSYR	100,00%	99,70%	
				VVSISLR	100,00%	98,30%	
				YSFDITHTVK	100,00%	99,70%	
				FVSEYGYQSWPSFSTLEK	100,00%	98,20%	

				SELEQSFHVTSLADTY	100,00%	98,10%	
Secretoglobin family 1D member	SG1D_BOVIN	11294,80	8.38	NRLIITNILGK	100,00%	98,80%	21,57%
				YNAPPEAVAAK	100,00%	99,40%	
Uncharacterized protein	A0A3Q1MDA5_BOVIN	43386,10	6.54	GVDAQVAALIAR	100,00%	99,70%	20,52%
				IKPFLGGASTEDLR	100,00%	99,70%	
				KLDEFYPQGYPQSLIER	100,00%	94,80%	
				LLGPNLVGLK	100,00%	99,70%	
				QVNLIPTTYQQLHIFK	100,00%	96,10%	
				YVGGGGQLDK	100,00%	99,70%	
Seminal plasma protein BSP-30 kDa	SFP4_BOVIN	21269,90	5.73	ANDLNAVFEFGPACAFPFITYK	100,00%	99,70%	40,98%
				FCTERDEPECVFPFIYR	100,00%	99,70%	
				VHSFFWR	100,00%	98,70%	
				WCSLTSNYDRDK	100,00%	99,70%	
				KNSVLLWCSLDTEYQGNWK	100,00%	99,30%	
WAP four-disulfide core domain 2	F6R695_BOVIN	16937,63	4.5	ACVLDEDCDDNLK	99,80%	99,70%	21,95%
				DQCQVDSQCPDALK	99,80%	99,70%	
Uncharacterized protein	A0A3Q1M3L6_BOVIN	40474,80	5.16	EPQVYVLAPPQEELSK	100,00%	99,70%	19,35%
				IQHQDWTGGK	100,00%	99,70%	
				PEPVTVTWNSGALK	100,00%	99,70%	
				VHNEGLPAPIVR	100,00%	99,70%	
				YGTTPPQLDADSSYFLYSK	100,00%	98,70%	
Tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2_BOVIN	26674,89	9.06	IPSYYYDR	100,00%	99,70%	10,26%
				YYFNPR	100,00%	97,40%	
				RAPVFCYSPK	100,00%	97,90%	

Beta-nerve growth factor	NGF_BOVIN	26669,48	9.72	HWNSYCTTHTFVK	100,00%	99,30%	22,41%
				IDTACVCVLSR	100,00%	99,70%	
				LQHSLDTVLR	100,00%	99,70%	
				QYFFETK	100,00%	98,80%	
				AHSAPAGPIAAR	100,00%	97,60%	
Complement factor B	CFAB_BOVIN	85366,31	7.87	GIPEFYDYDVALVR	100,00%	99,70%	15,64%
				LEDRVITYYCNR	100,00%	98,80%	
				STGSWSTLQTQDR	100,00%	99,70%	
				VKDVSEVVTPR	100,00%	99,70%	
				YETTIRPICLPCTEGSIQALR	100,00%	98,70%	
				YGLVTYATEPK	100,00%	99,70%	
				YLLDIGR	100,00%	99,60%	
				AGQVLEYLCPSGFYPYPTQIR	100,00%	94,80%	
				RPQQVPGYAR	100,00%	98,90%	
Ribonuclease pancreatic	RNAS1_DAMKO	13.711,17	9.60	QTGSSKYPBCAYK	100,00%	99,70%	16,13%
				YPDCAYK	99,70%	97,30%	
Beta-hexosaminidase	H7BWW2_BOVIN	61263,70	7.64	AGPSCAVLQEAFFR	100,00%	99,20%	21,42%
				GILIDTSR	100,00%	98,00%	
				GPVATLTANR	100,00%	99,70%	
				GSYSLSHVYTPNDVR	100,00%	98,20%	
				LFYLSPGNFFFGHSPTSK	100,00%	97,90%	
				LLPGTVVQVWK	100,00%	99,70%	
				TVIEYAR	100,00%	97,50%	
				VLPEFDSPGHTESWGK	100,00%	94,80%	
				VWGVLR	100,00%	96,20%	
				YYDYIFGFYK	100,00%	97,70%	

Uncharacterized protein	G3N0V0_BOVIN	35951,52	8.05	AVGVSIDCSK	100,00%	99,60%	21,17%
				EPSVFIFPPKPK	100,00%	99,40%	
				GLSAPIVR	100,00%	99,60%	
				VVSALPIQHQDWTGGK	100,00%	94,60%	
				VYPLASR	100,00%	95,70%	
				EPQVYVLDPPKEELSK	100,00%	95,70%	
SCGB2A2 protein	A6QPK0_BOVIN	10427,09	4.95	AYLKDFAQTDVEK	100,00%	99,70%	27,17%
				SVDPTVSKDEYR	100,00%	99,70%	
Ephrin-A1	EFNA1_BOVIN	23838,27	6.69	FTGFTLSK	99,80%	98,10%	9,27%
				FWNEDYTVHVR	99,80%	99,70%	
Acrosin	G5E5C6_BOVIN	45494,22	9.64	EVEWGSNKPVKPPLQER	100,00%	99,70%	28,38%
				ITPPVICGHFIGPGCLPQFR	100,00%	99,70%	
				RLQQLIEVLK	100,00%	94,60%	
				STNVCAGYPEGK	100,00%	99,70%	
				VPQTCWVAGWGFLR	100,00%	99,70%	
				YSASSEANDIALIK	100,00%	99,70%	
				AKRPGVYTSTWSYLNWIASK	100,00%	96,90%	
Beta-microseminoprotein OS=Bos taurus OX=9913 GN=MSMB PE=3 SV=2	G3X8E3_BOVIN	12161,81	5.00	DLSGVTHELK	99,80%	99,60%	18,02%
				ETCTYTVLEK	99,80%	99,70%	
5'-nucleotidase	A0A3Q1MCG3_BOVIN	63050,28	6.44	ISGLYSPYK	100,00%	99,70%	13,76%
				KVPVVQAYAFGK	100,00%	99,70%	
				VILPSFLVSGGDGFR	100,00%	99,70%	
				VLYPAVEGR	100,00%	99,70%	
				VPSYEPLR	100,00%	98,50%	
				EVPAGQYPFIVTSDDGR	100,00%	99,70%	

				LEVLCTQCR	100,00%	99,70%	
C-C motif chemokine	A5PJF7_BOVIN	11100,12	9.57	EAVIFK	100,00%	99,70%	19,19%
				QKWVQDSINYLNK	100,00%	99,70%	
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB_BOVIN	23743,52	9.33	IEVEKPFAlAK	100,00%	98,80%	25,46%
				IGDEDIGR	100,00%	99,60%	
				TVDNFVALATGEK	100,00%	99,70%	
				VVIGLFGK	100,00%	99,70%	
				VYFDLR	100,00%	98,50%	
				VLEGMDVVR	100,00%	99,70%	
Deoxyribonuclease	FIMGQ1_BOVIN	34936,31	9.36	DFVIVPLHTTPETSVR	100,00%	98,40%	42,95%
				EIDELADVYTDVKR	100,00%	99,70%	
				EPFVWFQSPYTAVK	100,00%	99,70%	
				EQYAFLYK	100,00%	96,80%	
				GITYNYVISSR	100,00%	99,70%	
				KGITYNYVISSR	100,00%	99,50%	
				ALDVSDHFPVEFK	100,00%	95,20%	
				FVWLIGDQEDTTVKK	100,00%	99,30%	
				GQNIVNSVVPQSNLVDFQK	100,00%	99,10%	
				ICSFNVR	100,00%	98,20%	
Hyaluronidase	F1MTV1_BOVIN	62281,12	8.79	NPQLSFPEASK	100,00%	99,30%	15,19%
				SATGQFITLFYADR	100,00%	99,70%	
				STQNAALYVR	100,00%	99,70%	
				IAKVDFETAGK	100,00%	98,90%	
				YTVPGTVTLEDLQK	100,00%	95,80%	
				DVYRDESVLVLQK	100,00%	99,40%	

				LGYYPHIDEK	100,00%	99,20%	
Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like	F1N1Z8_BOVIN	16970,30	8.71	DNENEITGIR	100,00%	99,70%	32,90%
				GGGSYFSTTK	100,00%	97,90%	
				SFSAFPDGSEK	100,00%	99,70%	
				VFIGIGGIK	100,00%	99,70%	
				VLTVGDFGQHK	100,00%	99,60%	
IGL@ protein	Q3T101_BOVIN	24640,00	5.84	TLIYGDTSR	99,80%	96,30%	10,21%
				YAASSYLSLTSSDWK	99,80%	99,70%	
Galectin-3-binding protein	LG3BP_BOVIN	62126.88	5.39	EVEALVGQVR	100,00%	99,60%	12,07%
				GCDLFITVK	100,00%	99,30%	
				LILSTNPEAHGLWK	100,00%	98,40%	
				RIDVSLSSVK	100,00%	99,70%	
				SNPTIGYENR	100,00%	95,70%	
				STSLFPCPSGVFSR	100,00%	98,80%	
Osteopontin	OSTP_BOVIN	30904,01	4.49	GDSVAYGLK	100,00%	99,70%	13,67%
				ISHELDSASSEVN	100,00%	99,70%	
				YPDAVATWLKPDPSQK	100,00%	98,10%	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	G3PT_BOVIN	43287,96	8.32	AGIALNDNFVK	100,00%	99,40%	21,77%
				ELIVGINGFGR	100,00%	99,60%	
				GAHQNIIPASTGAAK	100,00%	94,70%	
				LAQTPYSAIKDAIK	100,00%	97,00%	
				LISWYDNEYGYSNR	100,00%	99,70%	
				VPTPDVSVVDLTCR	100,00%	99,70%	

				VVDLVR	100,00%	99,30%	
Beta-actin (Fragment)	A0A344MNR4_SYNCA	40578,45	5.66	AGFAGDDAPR	100,00%	99,70%	19,78%
				GYSFTTTAER	100,00%	99,50%	
				IIAPPER	100,00%	97,70%	
				SYELPDGQVITIGNER	100,00%	99,70%	
				VAPEEHPVLLTEAPLNPK	100,00%	99,50%	
				AVFPSIVGRPR	100,00%	97,20%	
Glutathione peroxidase	F1MCF5_BOVIN	23986,73	8.20	FLVGPDGIPVMR	100,00%	99,70%	28,64%
				QEPGENSEILPGLK	100,00%	95,70%	
				TDILAYMK	100,00%	98,90%	
				VFTFLK	100,00%	96,80%	
				YVRPGGGYVPNFQLFEK	100,00%	96,90%	
Uncharacterized protein	A0A3Q1M1V3_BOVIN	16015,40	5.66	CVFCNAVVESR	100,00%	99,70%	27,08%
				GIGIACTK	100,00%	98,90%	
				GTLYFVK	100,00%	99,50%	
				TYSNECMYCFLNR	100,00%	99,70%	
Glutathione peroxidase (Fragment)	L8HZT1_9CETA	16176,62	6.66	FLVGPDGVPVMR	100,00%	99,70%	32,39%
				NSEILMGLK	100,00%	99,70%	
				SDMLEYLK	100,00%	98,30%	
				YVRPGGGFVPNFQLFEK	100,00%	97,00%	
Carboxypeptidase Q	CBPQ_BOVIN	51679,11	5.55	LALLVDVTGPR	99,80%	99,70%	4,24%
				VGALASLIR	99,40%	99,10%	
Uncharacterized protein	G3MX67_BOVIN	40778,77	5.92	IIVDPWK	100,00%	99,20%	17,75%
				SNFCYSIEECR	100,00%	97,70%	
				AAHPQIMDIANR	100,00%	99,70%	

				ALITVAK	100,00%	99,70%	
				ILITESNK	100,00%	97,60%	
				LLTDQDR	100,00%	97,60%	
				STGGLLLTIWK	100,00%	99,70%	
Lactoferrin	G1CW25_BOVIN	78158,40	8.70	AAHVEQVLLR	99,80%	99,00%	2,54%
				LLCLDGSR	99,80%	99,60%	
Uncharacterized protein	F1MBJ3_BOVIN	113904,09	6.71	FIAVEQEYFR	100,00%	99,70%	7,22%
				VGPLELNR	100,00%	99,70%	
				ALISGLR	100,00%	97,20%	
				GLGSVVSVEER	100,00%	99,70%	
				GSQGSDBGVLLCHHIEQEYR	100,00%	95,00%	
				VSITDESGLPVPVPAQVQR	100,00%	98,80%	
BPI fold-containing family B member 1	F1MLW2_BOVIN	51715,97	8.87	LLNNITTK	100,00%	95,30%	10,78%
				VIDETAAAQLGPTQIVK	100,00%	99,70%	
				VISLLTPALPK	100,00%	99,70%	
				APLDVVAGFNVPLFK	100,00%	99,70%	
Phosphatidylethanolamine- binding protein 4	Q3T010_BOVIN	25145,74	5.87	HWLVSDIK	100,00%	98,90%	17,94%
				IQQQELSPYHPPSPPAHSGLHR	100,00%	97,40%	
				ITTWPEPIVK	100,00%	99,20%	
Peptidoglycan recognition protein 1	PGRP1_BOSIN	21037,01	9.62	AAQSLACGAAR	99,90%	99,70%	15,79%
				GYLTPNYEVK	99,90%	98,40%	
				VPPASALR	100,00%	99,70%	
Uncharacterized protein	G3MXB5_BOVIN	36405,39	5.57	SAEGASFTWNPTGGK	100,00%	99,70%	9,88%
				SSLTATIKK	100,00%	99,70%	

				WLQGNQELPR	100,00%	99,70%	
Cystatin	Q5DPW9_BOVIN	16355,94	7.63	AHSQLVAGIK	100,00%	95,40%	37,58%
				KVGELQELSPNDPQVQK	100,00%	99,70%	
				DITILR	100,00%	98,70%	
				SAVAGDHVDLTTCPAAEAQQEK	100,00%	97,40%	
Prosaposin	SAP_BOVIN	58051,38	5.08	DVITAAGNLLK	99,90%	99,70%	7,43%
				EQILAALEK	99,90%	99,50%	
				KLVGYLDR	99,80%	95,70%	
				GCSFLPDQYRK	100,00%	95,20%	
DPP7 protein	A6QNX2_BOVIN	53642,32	5.07	DLTQLFGFAR	99,80%	99,70%	3,89%
				RLEAALIGK	99,80%	99,70%	
C1QTNF5 protein	A5PJL8_BOVIN	25349,48	6.06	ASLQFDLVK	100,00%	99,30%	15,23%
				VLVNEQGHYDAVTGK	100,00%	95,40%	
				VPPPSDAPLPFDR	100,00%	99,70%	
Ig gamma-3 chain C region (Fragment)	L8HKR7_9CETA	33279,67	7.98	GLPAPIVR	99,80%	98,40%	8,50%
				TTPPQLDADSSYFLYSK	99,80%	98,10%	
Beta-glucuronidase	A3KMY8_BOVIN	74469,62	6.00	EITLPQR	100,00%	95,80%	10,12%
				ELDGLWSFR	100,00%	99,10%	
				FDFFNAGLHR	100,00%	99,40%	
				LVQSGPLSSCR	100,00%	97,90%	
				SAAFLLR	100,00%	99,60%	
				LTAQTAVGPVSDFYTLPGIR	100,00%	96,10%	
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4	Q32LF7_BOVIN	39460,53	9.34	LVFKPDLTLEEVQAK	100,00%	99,50%	10,56%

				VAILIPHR	100,00%	97,20%	
				YSGYFGGVTALSR	100,00%	99,70%	
Phosphoglycerate kinase	L8HZ66_9CETA	44749,97	8.47	ALENPERPFLAILGGAK	100,00%	99,70%	11,75%
				LGDVYVNDAFGTAHR	100,00%	99,70%	
				AEPDKIEAFR	100,00%	99,10%	
				ELDYFSK	100,00%	98,70%	
Gelsolin	GELS_BOVIN	81105,11	5.44	AGALNSNDAFVLK	100,00%	95,50%	4,38%
				AGKEPGLQIWR	100,00%	95,90%	
				TGALELLR	100,00%	99,70%	
PIGR protein	PIGR_BOVIN	82434,82	7.07	FYSFEK	100,00%	97,90%	7,40%
				TVTINCPFTR	100,00%	99,10%	
				VVQGEPSLK	100,00%	99,70%	
				GGSVTVSCPYNPK	100,00%	98,90%	
				SSVTFDCSLGPEVANVPK	100,00%	99,70%	
Cathelicidin-1	CTHL1_BOVIN	17600,07	7.58	AVDQLNEQSSEPNIYR	100,00%	99,70%	29,68%
				CEGTVTLTDQVR	100,00%	99,30%	
				LLELDQPPQDDEDPSPKR	100,00%	98,80%	
Uncharacterized protein	A0A3Q1MGL5_BOVIN	35988,55	4.69	GSWGTVCDDSWDTNDANVCR	100,00%	99,70%	12,43%
				QLGCGSAISAPGGAR	100,00%	99,70%	
				VEVLYR	100,00%	98,10%	
Alpha-mannosidase	E1BHP0_BOVIN	113630,64	7.34	FIIVDQEFFR	100,00%	99,00%	4,33%
				LWWDGVASAK	100,00%	95,90%	
				YANTLSYNVR	100,00%	99,70%	
				SLTGTWDVSTLHR	100,00%	97,20%	
Cathepsin D	A0A3Q1M3Z5_BOVIN	42465,74	6.71	VGLAEAARL	100,00%	95,80%	9,72%

				LLDIACWTHR	100,00%	99,10%	
				YATGPAVR	100,00%	99,10%	
				VSSLPQVTVK	100,00%	96,90%	
Acrosin binding protein	E1B7S8_BOVIN	61272,56	4.99	FFALLTPTWK	99,90%	99,70%	3,87%
				FYGLDLYGGLR	99,90%	94,70%	
Uncharacterized protein	E1B9P4_BOVIN	26014,70	8.27	ANSLSPWCSTR	100,00%	99,70%	28,70%
				CVFPFIYR	100,00%	98,60%	
				DSCIFPFTYK	100,00%	98,80%	
				GSTYFSCTR	100,00%	98,40%	
				HCLTEDYPR	100,00%	99,70%	
				ISSLVPGFPCHPFNKY	100,00%	97,30%	
Zinc-alpha-2-glycoprotein	ZA2G_BOVIN	33851,73	5.11	EGSHTFQGAFGCELR	100,00%	99,70%	17,39%
				SIGLHWTR	100,00%	97,60%	
				SLTRPLTVPWDPR	100,00%	98,40%	
				EIPAWVPLDPAAQNTK	100,00%	95,60%	
Cathepsin L1	CATL1_BOVIN	37346,90	6.55	LFHEPLLVDVPK	99,90%	99,00%	7,78%
				LVSLSEQNLVDCSR	99,90%	99,70%	
GLIPR1-like protein 1	GPRL1_BOVIN	27167,23	8.84	FIEECLR	99,80%	96,80%	6,22%
				KFYDFNTR	99,80%	99,70%	
Fibrinogen gamma-B chain	F1MGU7_BOVIN	50231,97	5.44	FLQEIYNSNSQK	100,00%	99,70%	13,77%
				IHLISTQSTIPYVLR	100,00%	99,70%	
				LAIGEGQQHQLGGAK	100,00%	98,00%	
				TSTADYASFK	100,00%	99,70%	
				IQLEDWNGR	100,00%	96,00%	
Vanin 2	A5D9D1_BOVIN	52621,36	7.25	ILFAEVDSHPR	100,00%	99,70%	8,78%

				LAPEKFEVLEDGR	99,90%	99,70%	
				STDVTTTCGQPVETALTR	99,90%	98,90%	
Uncharacterized protein	W5PS94_SHEEP	5352166,00	5.13	ELDFVSHHVR	99,80%	97,80%	7,17%
				LSQETEALGR	100,00%	99,70%	
				LVTLEEFLLASTQR	100,00%	99,70%	
Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS_BOVIN	21229,22	6.43	SLGFTEEGIVFLPK	100,00%	99,70%	13,61%
				AEVKEHFTTFAK	100,00%	98,70%	
Cysteine-rich secretory protein 2	Q3ZCL0_BOVIN	27453,25	8.64	FADLSNTLK	99,80%	98,20%	10,25%
				YLYVCQYCPAGNIVGR	99,80%	99,70%	
Immunoglobulin J chain	Q3SYR8_BOVIN	17857,34	5.07	IIPSAEDPSQDIVER	99,80%	99,70%	14,65%
				IIVPLNSR	99,80%	99,60%	
Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_BOVIN	21663,94	8.40	IIFVVGPGSGK	100,00%	99,70%	12,89%
				YGYTHLSTGDLLR	100,00%	99,40%	
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	BIP_BOVIN	72400,03	5.07	IINEPTAAAIAYGLDKR	100,00%	99,70%	4,73%
				ITPSYVAFTPEGER	100,00%	98,50%	
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	RL40_BOVIN	14728,32	9.87	ESTLHLVLR	99,80%	99,50%	19,53%
				TITLEVEPSDTIENVK	99,80%	98,90%	
Serotransferrin	TRFE_BOVIN	77753,15	6.75	DKPDNFQLFQSPHGK	100,00%	99,70%	5,40%
				ILESGPFVSCVK	100,00%	97,80%	
				ELPDPQESIQR	100,00%	99,50%	
MGC148336 protein	A6QPE2_BOVIN	17816,30	5.94	AVQGLLQYINK	100,00%	99,40%	23,38%
				ELHLAIPAEITR	100,00%	99,70%	
				EKLNQVANAVYQR	100,00%	97,20%	

Heat shock 70 kDa protein 13	HSP13_BOVIN	51920,49	5.18	ILVPIQQVLK	99,80%	98,40%	3,61%
				LLQYLYK	99,80%	98,90%	
Glutathione peroxidase 3	GPX3_BOVIN	25663,37	6.84	FLVGPDGIPIMR	100,00%	95,70%	15,49%
				FYTFLK	100,00%	94,70%	
				YVRPGGGFTPNFQLFEK	100,00%	97,40%	
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	QPCT_BOVIN	41224,03	6.04	SFSNIISTLNPTAK	99,80%	99,50%	6,93%
				YPGSPGSFAAR	99,80%	96,90%	
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_BOVIN	20985,75	6.96	GNNISSGTVLSDYVGSPPK	99,80%	97,70%	24,60%
				YGGAEVDELGK	99,80%	97,70%	
				NRPTSITWDGLDPGK	99,10%	99,10%	
Interleukin 4 induced 1	F1N191_BOVIN	64479,10	9.57	IAFTPPLTR	99,90%	95,50%	6,06%
				LALDDVAALHGPIAYR	99,90%	99,50%	
				IVGGWDLLPR	99,10%	99,20%	

Anexo 2. Proteínas não caracterizadas do plasma seminal de touros Nelore.

Protein Access Uniprot	Protein Name	Max Score	Total score	Query cover	e-value	Perc. Identify	Protein Access NCBI
A0A3Q1M858_BOVIN	Epididymal-specific lipocalin-5 [Bos taurus]	368	368	100%	9,00E-129	100.00%	XP_010808932.1
E1BLI4_BOVIN	Carbohydrate-binding protein AQN-1 isoform X2 [Bos taurus]	227	227	86%	2,00E-74	100.00%	XP_010818423.1
A0A3Q1MDA5_BOVIN	Mesothelin precursor [Bos taurus]	758	758	96%	0.0	100.00%	NP_001093844.
A0A3Q1M3L6_BOVIN	Membrane-bound immunoglobulin gamma1 heavy chain constant region [Bos taurus]	742	784	100%	0.0	98.09%	ANN46376.1
G3N0V0_BOVIN	Immunoglobulin gamma heavy chain [Bos taurus]	667	707	100%	0.0	98.47%	AQT27059.1
G3MX67_BOVIN	Protein LEG1 homolog [Bos taurus]	734	734	100%	0.0	100.00%	XP_010806841.1
F1MBJ3_BOVIN	Epididymis-specific alpha-mannosidase-like [Bos taurus]	1863	1863	100%	0.0	92.76%	XP_024849427.1
G3MXB5_BOVIN	IgM precursor [Bos taurus]	698	698	100%	0.0	100.00%	NP_001192115.1
A0A3Q1MGL5_BOVIN	Deleted in malignant brain tumors 1 protein isoform X15 [Bos taurus]	607	5079	97%	0.0	88.07%	XP_024841759.1
E1B9P4_BOVIN	Epididymal sperm-binding protein 1 precursor [Bos taurus]	463	463	100%	3,00E-165	100.00%	NP_001179487.1
W5PS94_SHEEP	Nucleobindin-1 isoform X1 [Bos taurus]	776	776	100%	0.0	94.78%	XP_005219247.1
A0A3Q1M1V3_BOVIN	Double-headed protease inhibitor, submandibular gland [Bos taurus]	300	300	100%	5,00E-103	100.00%	XP_002689349.1