



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

FÁGNER CAVALCANTE PATROCÍNIO DOS SANTOS

**ESTRATÉGIAS "ÔMICAS" PARA O ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES
DA FERTILIDADE: MAPEAMENTO DAS PROTEÍNAS SEMINAIS COM AFINIDADE
À GELATINA E HEPARINA DE ESPÉCIES DOMÉSTICAS E METABOLOMA DOS
ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

FORTALEZA

2017

FÁGNER CAVALCANTE PATROCÍNIO DOS SANTOS

ESTRATÉGIAS "ÔMICAS" PARA O ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES DA
FERTILIDADE: MAPEAMENTO DAS PROTEÍNAS SEMINAIS COM AFINIDADE À
GELATINA E HEPARINA DE ESPÉCIES DOMÉSTICAS E METABOLOMA DOS
ESPERMATOZOIDES BOVINOS

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura

Co-orientador: Dr. Jorge André Mathias Martins

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S235e Santos, Fágner Cavalcante Patrocínio dos.
Estratégias "ômicas" para o estudo de marcadores moleculares da fertilidade: mapeamento das proteínas seminais com afinidade à gelatina e heparina de espécies domésticas e metaboloma dos espermatozoides bovinos / Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos. – 2017.
180 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura.
Coorientação: Prof. Dr. Jorge André Mathias Martins.
1. Ácidos graxos. 2. Espermadesinas. 3. GC-MS. 4. Fenótipos. 5. Proteômica. I. Título.

CDD 636.08

FÁGNER CAVALCANTE PATROCÍNIO DOS SANTOS

ESTRATÉGIAS "ÔMICAS" PARA O ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES DA
FERTILIDADE: MAPEAMENTO DAS PROTEÍNAS SEMINAIS COM AFINIDADE À
GELATINA E HEPARINA DE ESPÉCIES DOMÉSTICAS E METABOLOMA DOS
ESPERMATOZOIDES BOVINOS

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Aprovada em: 25/08/17.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dra. Cláudia Roberta de Andrade
Universidade Christus (UNICHRISTUS)

Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Maurício Fraga Van Tilburg
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Ricardo Toniolli
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

“O próprio senhor irá a sua frente com você;
ele nunca o deixará, nunca o abandonará.
Não tenha medo! Não desanime!”

Deuteronômio 31:8

Aos meus pais, Fafá e Heraldo, pessoas grandiosas, que me apoiaram na conquista deste sonho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o ser que mais amo nesta vida, que vem obrando milagres e mostrando oportunidades a cada dia em meus caminhos.

Aos meus pais Maria de Fátima (Fafá) e Heraldo por sempre apoiarem meus sonhos.

Às minhas maravilhosas irmãs Flávia e Mariângela e, ao meu cunhado, Aristides, com quem eu sempre pude contar.

Aos meus sobrinhos queridos Beatriz e Davi.

Que alegrem os meus dias.

A minha super vó e segunda mãe, Noeme.

Ao meu orientador Dr. Arlindo Moura. Agradeço pelo apoio, incentivo, pelas ideias, paciência, orientação, ensinamentos, confiança e por acreditar na minha capacidade. Muito obrigado!

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela concessão da minha bolsa de estudos no país e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por ter concedido a oportunidade do doutorado sanduíche e a bolsa de estudos no exterior.

Às minhas maravilhosas tias e que as considero minhas outras mães Maria José (Zezé), Angelina, Marlúcia, Maria das Dores (Dorinha), Noélia e Luciene. Aos meus tios José Nilson, Neto e Antônio. Sempre presentes em minha vida.

Agradeço aos meus primos e primas: Monalyza, Thesco, Angélica, Ângelo, Mônica, Camila, Gil, Gilliene, Hugo, Carlos Eduardo, João Pedro, Bruno, Luiz Antônio, Miguel e Matheus. Agradeço por nossa forte união, como irmãos, sempre.

Aos melhores amigos que pude contar para todos os momentos: Valdir Barros, Gaby Deniur, Fátima Alves, Clebio Ferreira, Cleverton Albuquerque e Iury Ibiapina. Obrigado por serem essas pessoas tão especiais, por alegrarem os meus dias e pela amizade duradoura que se fortalece mais a cada dia.

A minha grande amiga Ana Luiza. Do doutorado para vida. Você é especial, veio pra somar e pra ficar, obrigado pela grande ajuda nos estudos e na vida.

Às outras amigas do doutorado também especiais, Solange e Moemia. “Olha elas”. Agradeço por me fazerem rir, por poder confiar e contar com vocês em todos os momentos.

Agradeço aos amigos e colegas do laboratório de Fisiologia Animal, não menos importantes, Aderson, Arabela, Bruna Farias, Bruna Félix, Davide, Deis, Dayane Barbosa, Kaká, Kamila Sousa, Mayra Vetorazzi, Monica Marcela, Révila Bianca, Ronaldo, Tarciane Alves e Thiago. Vocês foram peças fundamentais na realização desse sonho, obrigado pela amizade, companheirismo, momentos de diversão, pelas ajudas nos experimentos e pelos conselhos pra vida.

E aos mais antigos e novatos, também presentes nessa caminhada, Maurício, Rodrigo Oliveira, Danúsia, Aline, Mayara, Tatiana Prata, Walfran, Fábio e Maria Júlia.

Agradecimento especial ao meu co-orientador no Brasil, o Jorge. Muito obrigado pelos ensinamentos.

Aos meus co-orientadores em USA, Dr. Memili, Dr. Dinh e Érika. Agradeço pelos conselhos, orientação e apoio. Vocês foram essenciais na realização desse sonho.

Aqueles dos momentos de descontração Whatisson Moita, Rayanne Mourão, Ingrid (Didi), Brenim, Lilian, Raiane, Raul, Janaína, Jefferson Barros, Alexsandra e Jeferson Freitas.

Agradeço também ao coordenador do doutorado em Zootecnia da UFC, professor Ednardo, e a secretária da coordenação Francisca, por sempre estarem solícitos nos momentos em que precisei.

A Universidade Federal do Ceará e a Mississippi State University.

Aos meus amigos de Starkville: Emily, Adam, Tracy Lee, Hassan, Anuhaj, Erickmar, Fábio, Adroaldo, Lucas, Midian, Fernando, Pedro e Rosana.

A todos os professores, alunos e funcionários do departamento de Animal and Dairy Science da Mississippi State University.

E aos demais que de alguma forma, estiveram comigo nessa caminhada.

Obrigado pelo apoio, pela torcida, incentivo, pelas forças, orações, momentos de descontração, por eu ter sempre um ombro amigo pra poder contar, seja num momento pessoal ou profissional.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
AAF	Antígeno associado à fertilidade
AF	Alta fertilidade
ANXA5	Anexina
AQN-3	Proteína de ligação a carboidrato AQN-3
ATP	Adenosina trifosfato
bdh-2	Bodesina 2
BF	Baixa fertilidade
BSP	Proteína de ligação ao espermatozoide
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsil)trifluoroacetamida
Ca²⁺	Cálcio
CCL2	C-C motif quimiocina 2
cDNA	DNA complementar
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLU	Clusterina
Conc	Concentração
CRISP3	Proteína secretória rica em cisteína 3
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EC-EM	Eletroforese de capilaridade acoplada à espectrometria de massas
EI	Espectrometria de impacto de elétrons
eV	Elétron-volt
FDR	False Discovery Rate

FPLC	Cromatografia Líquida de Eficiência Rápida
g	Gravidade
h	Hora
HYAL2	Hialuronidase
kDa	Quilodaltons
kV	Quilovolts
LTF	Lactotransferrina
M	Molar
m/z	Razão massa/carga
mAu	Mili unidade ampere
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Espectrometria de massas
P1	Pico 1
P2	Pico 2
P3	Pico 3
PAFS	Proteína ácida do fluido seminal
PBS-T	Tampão fosfato salino com 0,1% de Tween 20
pH	Potencial hidrogeniônico
PLG	Proteínas de ligação à gelatina
PLH	Proteínas de ligação à heparina
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
PNLG	Proteínas não ligantes à gelatina
PNLH	Proteínas não ligantes à heparina
PPIB	Peptidil prolil cis-trans isomerase B
PSP-I	Glicoproteína mais abundante do plasma semina PSP-I
PSP-II	Glicoproteína mais abundante do plasma seminal PSP-II
R	Resolução
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
S100A11	Proteína S100
SPDA1	Espermadesina 1
TIMP2	Tecido inibidor de metalopeptidase 2
TMCS	Trimethylchlorosilane
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Uma	Unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta
V	Volt
VIP	Variáveis de Importância na Projeção

RESUMO

A fertilidade animal é um fator que afeta a eficiência reprodutiva nos rebanhos e, conseqüentemente, causa um forte impacto na economia para a produção de carne e leite. Assim, ferramentas biotecnológicas, como a proteômica e a metabolômica vêm sendo utilizadas e representa um avanço potencial para a escolha de reprodutores de fertilidade comprovada nos rebanhos. Biomoléculas, tais quais as proteínas de ligação à gelatina (PLG) e heparina (PLH) e metabólitos, participam de diversos eventos fisiológicos na célula espermática até a fertilização. Dessa forma, essas biomoléculas seminais podem ser utilizadas como biomarcadores para fertilidade em diversas espécies. Assim, os objetivos do presente trabalho foram (1) identificar o perfil das PLG e PLH no plasma seminal de espécies domésticas e (2) identificar metabólitos espermáticos associados à fertilidade em touros Holstein. Para alcançar o objetivo do estudo 1, o plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos foram submetido à cromatografia líquida de eficiência rápida (FPLC) e a espectrometria de massas. Adicionalmente, utilizaram-se ferramentas de bioinformática para avaliar os processos fisiológicos os quais essas proteínas estão envolvidas. O total de PLG foram em bovinos (354), caprinos (103), ovinos (51), coelhos (146), equinos (25) e suínos (87). Dentre as PLG mais abundantes, identificaram-se proteínas da família das espermadesinas. O total das PLH foram em bovinos (894), caprinos (789), ovinos (647), coelhos (600), equinos (556) e suínos (86). As PLH com maiores concentrações incluem a bodesina 2, proteína S100, clusterina, PSP-I, PSP-II, dentre outras. As análises *in silico* mostram que essas moléculas participam, principalmente, dos processos biológicos celulares e possuem função molecular de ligação. Para alcançar o objetivo do estudo 2, identificaram-se através da técnica de CG-ES os metabólitos de espermatozoides de 10 touros com alta (n = 5) e baixa (n = 5) fertilidade. Adicionalmente, foram realizadas análises estatísticas multivariada e univariada através do programa MetaboAnalyst 3.0, para identificar os metabólitos associados a fertilidade. Os resultados mostraram que dentre os 41 diferentes metabólitos identificados nos espermatozoides, os níveis de quatro compostos foram diferentemente significativos e, portanto, podem ser utilizados como biomarcadores moleculares. Esses metabólitos foram aminometano e ácido azeláico (maiores em espermatozoides dos touros de baixa fertilidade) e ácido butírico e uréia (maiores nos espermatozoides dos touros de alta fertilidade). Os resultados da presente pesquisa são significativos porque ajudam a promover a

ciência animal básica e as proteínas e metabólitos identificados podem ser usados na biotecnologia reprodutiva para avaliar a qualidade do sêmen e prever a fertilidade de reprodutores.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Espermadesinas. Fenótipos. CG-EM. Proteomica.

ABSTRACT

Animal fertility is a factor that affects reproductive efficiency in herds and has a strong impact on the economy for meat and milk production. Thus, biotechnological tools such as a proteomic and metabolomic have been used and represent a potent tool for a choice of breeding with proven fertility for herds. Biomolecules such as gelatin-binding proteins (GBP) and heparin (HBP) and metabolites participate of several physiological events in the sperm cell until fertilization. Thus, these seminal biomolecules can serve as biomarkers for fertility in several species. Therefore, the objectives of the present study were (1) to identify the GBP and HBP profile in the seminal plasma of farm species and (2) to identify sperm metabolites associated with fertility in Holstein bulls. To achieve the objective of study 1 the seminal plasma of bovine, caprine, ovine, rabbit, equine and swine species were subjected to fast-performance liquid chromatography (FPLC) and mass spectrometry. In addition, bioinformatics tools were used to evaluate the physiological processes which these proteins are involved. The total GBP were in bovine (354), caprine (103), ovine (51), rabbit (146), equine (25) and swine (87) species. Among the most abundant GBP were identified proteins of spermadhesins. The total HBP were in bovine (894), caprine (789), ovine (647), rabbit (600), equine (556) and swine (86) species. The HBP with higher concentrations include bodhesin 2, protein S100, clusterin, PSP-I, PSP-II, among others. *In silico* analyzes shown that HBP mainly participate in cellular biological processes and have molecular binding function. To achieve the goal of study 2, the sperm metabolites of 10 bulls with high ($n = 5$) and low ($n = 5$) fertility were identified through GC-MS technique. In addition, multivariate and univariate statistical analyzes were performed through the MetaboAnalyst 3.0 program to identify metabolites associated with fertility. The results showed that among the 41 different metabolites identified in spermatozoa the levels of four compounds were significantly different and can be used as molecular biomarkers. These metabolites were aminomethane and azelaic acid (higher in spermatozoa of low fertility bulls) and butyric acid and urea (higher in spermatozoa of high fertility bulls). The results of this research are significant because they help to promote basic animal science and the proteins and metabolites identified can be used in reproductive biotechnology to evaluate the semen quality and predict reproductive fertility.

Key words: Fatty acids. GC-MS. Phenotypes. Proteomics. Spermatogenesis.

SUMÁRIO

1	PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À GELATINA E HEPARINA NO PLASMA SEMINAL DE ANIMAIS DOMÉSTICOS.....	19
2	INTRODUÇÃO	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
4	RESULTADOS	27
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÃO.....	60
7	METABOLÔMICA DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM A FERTILIDADE.....	62
8	INTRODUÇÃO	64
9	MATERIAL E MÉTODOS	65
10	RESULTADOS	68
11	DISCUSSÃO	77
12	CONCLUSÃO.....	81
13	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO A – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE BOVINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	96
	ANEXO B – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE CAPRINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	106
	ANEXO C – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	113

ANEXO D – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE COELHOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	118
ANEXO E – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE EQUINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	126
ANEXO F – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À GELATINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE SUÍNOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	128
ANEXO G – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE BOVINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	129
ANEXO H – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE CAPRINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	150
ANEXO I – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	159
ANEXO J – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE COELHOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	163
ANEXO K – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE EQUINOS.	

CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	171
ANEXO L – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE SUÍNOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.....	175
ANEXO M – DECLARAÇÃO DE REVISÃO ORTOGRÁFICA.....	179
ANEXO N – DECLARAÇÃO DE REVISÃO DE INGLÊS.....	180

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os aspectos fisiológicos associados à capacidade fecundante do gameta masculino ainda são pontos cruciais a se levar em consideração para o aumento do número de animais nos rebanhos. A complexidade para entender mecanismos pelos quais as células espermáticas conseguem fecundar um oócito vai além dos exames andrológicos e da espera de dados de fertilidade com base no número de montas ou inseminações artificiais. Desta forma, novas estratégias vêm sendo empregadas contribuindo para a identificação de marcadores moleculares associados à fertilidade em bovinos, suínos e humanos.

Abordagens “ômicas” para o estudo da fertilidade incluem a proteômica e a metabolômica, ambas têm complementariedade ao estudo genômico. Dentre as proteínas seminais envolvidas na fisiologia espermática destacam-se as proteínas de ligação à gelatina (PLG) e à heparina (PLH). As PLG e PLH atuam nos processos de espermatogênese, maturação espermática, capacitação, reação acrossômica, batimento flagelar e interação entre gametas em diversas espécies. Uma proteína de 29-30 kDa, denominada antígeno associado à fertilidade (AAF), foi identificada como uma PLH no plasma seminal de touros Gir e tem associação com as taxas de clivagem e alta produção de blastocisto. Outro estudo investigou que a ausência da PLH denominada tecido inibidor de metalopeptidase 2 (TIMP-2) no plasma seminal de bovinos estava associada à baixa fertilidade dos animais. Desta forma, a identificação desses grupos de proteínas no sêmen tem forte impacto para a seleção de animais aptos à reprodução.

Outra importante abordagem na predição da fertilidade em touros é a identificação de metabólitos candidatos a biomarcadores para fertilidade através da metabolômica, que investiga pequenas moléculas (< 1500 Da) e seu modo de ação em organismos. O fato dos metabólitos serem os produtos dos processos celulares nos dá precisão na investigação de mecanismos que estão ocorrendo em um exato momento, em um organismo. Desta forma, indicam os eventos em um fenótipo atual. Através da abordagem metabolômica, já se identificaram no plasma seminal de bovinos e humanos, potenciais biomarcadores moleculares para fertilidade e infertilidade. Um estudo realizado com o plasma seminal de bovinos mostrou que a taurina e a leucina estavam em alta abundância no plasma seminal de animais de alta fertilidade comparado com animais de baixa fertilidade, desta forma esses metabólitos podem ser utilizados como biomarcadores de fertilidade. Em outro estudo realizado para identificar metabólitos nos espermatozoides de

humanos os pesquisadores acharam que as classes de metabólitos mais abundantes na espécie são a de aminoácidos, peptídeos e análogos seguidos da classe dos lipídeos.

Portanto, abordagens proteômica e metabolômica têm contribuído nos avanços biotecnológicos na identificação de proteínas e metabólitos que regulam a fertilidade nos machos, entretanto há ainda uma necessidade de mais estudos a respeito dessas moléculas e suas associações com desordens fisiológicas em diversas espécies animais.

CAPÍTULO I – PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À GELATINA E HEPARINA NO PLASMA SEMINAL DE ANIMAIS DOMÉSTICOS

RESUMO

Pesquisas têm demonstrado a participação de dois grupos de proteínas seminais com importantes efeitos na reprodução, essas foram classificadas de acordo com a afinidade molecular, em proteínas de ligação à gelatina (PLG) e heparina (PLH). Os estudos sobre as PLH e PLG têm contribuído para o entendimento da biologia reprodutiva em diversas espécies, bem como na identificação de marcadores moleculares para os aspectos fisiológicos relacionados à fertilização. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar o perfil das proteínas ligadoras de gelatina e heparina no plasma seminal em três espécies ruminantes e três não-ruminantes. Para alcançar tal objetivo, o plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos foi submetido à cromatografia líquida de eficiência rápida (FPLC) e análise de espectrometria de massas. Adicionalmente, foram utilizadas ferramentas de bioinformática para avaliar os processos fisiológicos os quais essas proteínas estão envolvidas. Quando submetido à coluna de gelatina o plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos e equinos apresentaram um perfil de 3 picos cromatográficos e a espécie suína, 2 picos. Na coluna de heparina identificaram-se para bovinos, caprinos, ovinos, coelhos e equinos um perfil de 2 picos e 3 para suínos. O total de PLG foram em bovinos (354), caprinos (103), ovinos (51), coelhos (146), equinos (25) e suínos (87). Dentre as PLG mais abundantes, identificaram-se proteínas da família das espermedesinas. O total das PLH foram em bovinos (894), caprinos (789), ovinos (647), coelhos (600), equinos (556) e suínos (86). As PLH com maiores concentrações incluem a bodesina 2, proteína S100, clusterina, PSP-I, PSP-II, dentre outras. As análises *in silico* mostram que essas moléculas participam, principalmente, dos processos biológicos celulares e possuem função molecular de ligação. Com base na literatura, as PLG e PLH atuam em processos como espermatogênese, capacitação espermática, interação entre gametas, dentre outros. Desta forma, as PLG e PLH identificadas podem servir como potenciais biomarcadores nos processos fisiológicos reprodutivos.

Palavras-chave: Capacitação espermática. Cromatografia. Espermedesinas. Shotgun.

GELATIN AND HEPARIN-BINDING PROTEINS FROM SEMINAL PLASMA IN DOMESTIC ANIMALS

ABSTRACT

Researches have shown the participation of two proteins groups from seminal plasma with important reproductive effects, which were classified according with molecular affinity, the gelatin-binding (GBPs) and heparin-binding proteins (HBPs). Studies about GBPs and HBPs have contributed to the understanding of reproductive biology in several species, as well for identification of molecular markers for physiological aspects related with fertilization. Thus, the objective of this study was to identify the profile of the gelatin and heparin-binding proteins in three ruminant and three non-ruminant species. To achieve this goal, the seminal plasma of bulls, goats, sheep, rabbits, horses and pigs were subjected to fast-performance liquid chromatography (FPLC) following mass spectrometry. In addition, bioinformatics tools were used to evaluate the physiological processes which these proteins are involved. When submitted to the gelatin column, the seminal plasma of bulls, bucks, sheep, rabbits and horses presented a profile of 3 chromatographic peaks and the swine specie, 2 peaks. In the heparin column a profile of 2 peaks were identified for bulls, bucks, sheep, rabbits and horses and 3 peaks for pigs. A total of GBPs were in bulls (354), bucks (103), sheep (51), rabbits (146), horses (25) and pigs (87). We found among the most abundant GBPs proteins belongs spermadhesins family. The total of HBPs were in cattle (894), goats (789), sheep (647), rabbits (600), horses (556) and pigs (86). HBPs with higher concentrations include bodhesin-2, protein S100, clusterin, PSP-I, PSP-II, among others. *In silico* analyzes showed that these molecules mainly participate in cellular biological processes and have binding molecular function. Based on the literature the GBPs and HBPs acts in processes such as spermatogenesis, sperm capacitation, interaction between gametes, among others. In this way, the identified GBPs and HBPs can serves as biomarkers potential to reproductive physiological processes in several species.

Key words: Sperm capacitation. Chromatography. Spermadhesin. Shotgun.

2 INTRODUÇÃO

Desde a espermatogênese, proteínas, metabólitos e íons são produzidos e atuam nas células espermáticas de mamíferos, assim, contribuem para o desenvolvimento do gameta masculino e são necessários em processos subsequentes até a fertilização (HUANG; SHA, 2011; JUYENA; STELLETTA, 2012). Proteínas também secretadas pelos tecidos epididimários e pelas glândulas sexuais acessórias, constituintes do fluido seminal, participam de eventos importantes até a fertilização incluindo a maturação espermática (KIRCHHOFF *et al.*, 1998), manutenção de motilidade (DE SOUZA *et al.*, 2007; NOVAK *et al.*, 2010), capacitação espermática (ARAKI *et al.*, 2016), reação acrossômica (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2017), interação entre gametas (LUNA *et al.*, 2015) e no desenvolvimento embrionário inicial (RODRIGUEZ-VILLAMIL *et al.*, 2016) em diversas espécies.

Os mamíferos possuem uma linhagem evolutiva em comum. O progresso na evolução os diferiu em aspectos como características anatômicas e fisiológicas, incluindo nos caracteres reprodutivos, como o ciclo estral nas fêmeas (DOWNEY, 1980) e, nos machos, podemos citar a composição do fluido seminal, que embora composto por muitas moléculas homólogas interespecies, existem também substâncias exclusivas de uma determinada espécie (DRUART *et al.*, 2013). Uma importante característica em comum no plasma seminal de machos é o fato de existirem proteínas com similaridade na estrutura de aminoácidos, sendo moléculas homólogas, como as “bind of sperm proteins” (BSPs), já identificadas no plasma seminal de bovinos (MANJUNATH *et al.*, 2009), caprinos (VILLEMURE *et al.*, 2003), equinos e ovinos (BERGERON *et al.*, 2005).

Adicionalmente, estudos já demonstraram que as BSPs são as macromoléculas encontradas em maior abundância no plasma seminal da espécie bovina (MANJUNATH *et al.*, 1994; SCHEIT *et al.*, 1988). Nos caprinos e ovinos, proteínas homólogas às BSPs e espermedesinas compõem as macromoléculas em maior concentração (BERGERON *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2009; VILLEMURE *et al.*, 2003). No fluido seminal de equinos, as HSP-1 e HSP-2 são as mais abundantes (SANKHALA *et al.*, 2012). Na espécie suína as espermedesinas somam as proteínas seminais de maior concentração (CABALLERO *et al.*, 2008; CALVETE; CARRERA; *et al.*, 1996). Nos coelhos, as proteínas anexinas representam as moléculas encontradas em maior concentração (ARRUDA-ALENCAR *et al.*, 2012).

As proteínas seminais já foram classificadas de acordo com suas estruturas, funções, nas últimas décadas, de acordo com a afinidade cromatográfica molecular. Desta forma, as proteínas dos fluídos reprodutivos podem ser classificadas como proteínas de ligação à gelatina (PLG) e de ligação à heparina (PLH). As PLG e PLH desempenham importantes funções atuando, principalmente, em eventos para a capacitação espermática. As principais PLG incluem os grupos das BSPs, metalloproteinas de matriz (MMP) e as fibronectinas (FN). As proteínas de ligação à gelatina modulam a capacitação dos espermatozoides de bovinos (THERIEN *et al.*, 1997), atuam no processo de maturação das células espermáticas (CABALLERO, *et al.*, 2010), regulam os níveis de Ca^{2+} -ATPase, importante para o batimento flagelar das células espermáticas (SRIVASTAVA *et al.*, 2013), remodelam tecidos uterinos durante a gestação em ratas (YIN *et al.*, 2012) e durante o ciclo estral em búfalas (ROY; GHOSH, 2010) e modificam fatores enometriais para a implantação e o pré-parto em vacas (ULBRICH *et al.*, 2011).

Os principais estudos apontam que as proteínas de ligação à heparina inibem a liberação de prostaglandinas e estimulam a de interleucina-6 pelas células endometriais e cervicais em porcas e pelas células endometriais bovinas (MADEJ *et al.*, 2013) aumentam as taxas de reação acrossômica nos espermatozoides de búfalos (SINGH *et al.*, 2016) e tem função de molécula chaperonas em equinos (SANKHALA *et al.*, 2012). Portanto, estes achados sugerem que os estudos das moléculas PLG e PLH contribuem para a compreensão dos aspectos relacionados à biologia reprodutiva em diversas espécies. Assim, como na identificação de marcadores moleculares para fertilidade e, como consequência, aumento no número de animais nascidos.

Desta forma, necessita-se maiores investigações acerca destas biomoléculas o que fundamenta o objetivo do presente trabalho de identificar através das técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massas o perfil das proteínas de ligação à gelatina e heparina em três espécies ruminantes e em três não-ruminantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coletas de sêmen

O sêmen de tourinhos da raça Guzerá (n = 30) e de carneiros da raça Morada Nova (n = 20) foi coletado por meio de eletroejaculação (JIMENEZ-RABADAN *et al.*, 2016; REGO *et al.*, 2014). Já os ejaculados de caprinos da raça Sannen (n = 8), coelhos da raça Nova Zelândia variedade branca (n = 18) e garanhões Quarto de Milha (n = 5) foram obtidos por meio de vagina artificial (DOWSETT; PATTIE, 1980; JIMENEZ-RABADAN *et al.*, 2016; NAUGHTON *et al.*, 2003). O sêmen de cachaços sexualmente maduros (n = 12) foi coletado pelo método da mão enluvada (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014).

3.2 Obtenção do plasma seminal e quantificação das proteínas totais

Após as coletas, foi feita a mistura (*pool*) das amostras de ejaculados de cada espécie, separadamente. Em seguida, estas foram homogeneizadas, resuspensas em microtubos e centrifugadas a $700 \times g$, a 4°C , por 15 minutos para separar o plasma seminal dos espermatozoides. Posteriormente, o plasma seminal foi resuspenso e, mais uma vez, centrifugado a $5000 \times g$, a 4°C , por 1 hora, o sobrenadante foi então transferido para microtubos e armazenado a -20°C , até posteriores análises.

Após a descongelação de todas as amostras, a concentração das proteínas totais do plasma seminal foi determinada utilizando o equipamento *NanoDrop* 2000c seco HEP-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), por meio do método *ProteinA280* (YUE *et al.*, 2009).

3.3 Cromatografia líquida de eficiência rápida (FPLC)

Para a cromatografia de afinidade à gelatina alíquotas do *pool* do plasma seminal de cada espécie contendo 3 mg de proteínas totais foi diluída em uma solução de ligação (40 mM de Tris, 2 mM de CaCl_2 e pH 7,4), a fim de se obter uma mistura com um volume final de 2 mL. Em seguida, o volume de 2 mL da mistura foi injetado em um equipamento da ÄktaPrime (FPLC System, Pharmacia, Uppsala, Sweden) de cromatografia líquida de eficiência rápida (FPLC) acoplado a uma coluna preparativa de afinidade à gelatina de 25 mL (Gelatin SepharoseTM 4B; GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). Primeiramente, a amostra foi aplicada à coluna em um fluxo de 0,5 mL/min com solução de ligação durante 1 min, em seguida, aumentou-se o fluxo para 2 mL/min utilizando-se a solução de ligação, o fluxo manteve-se por 99 minutos para

retirar as proteínas sem afinidade à matriz da coluna. A solução de eluição (40 mM de Tris, 2 mM de CaCl₂, 8 M de uréia e pH 7,4) foi aplicada durante 40 minutos em um fluxo de 2 mL/min. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 140 minutos (MANJUNATH *et al.*, 1987).

Na coluna de heparina, foi utilizada uma solução de ligação contendo 40 mM de Tris, 2 mM de CaCl₂ e pH 7,4 e uma solução de eluição com 40 mM de Tris, 2 mM de CaCl₂, 1M de NaCl e pH 7,4. Utilizou-se um *loop* de volume final para 500 µL e aplicou-se um *pool* de plasma seminal de cada espécie contendo 3 mg de proteínas. Foi utilizada uma coluna com resina de heparina de volume de 1 mL (HiTrapTM Heparin HP; GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). À amostra foi aplicada na coluna em um fluxo inicial de 0,5 mL/min com solução de ligação durante 1 min, em seguida, foi aplicado um fluxo de 1 mL/min contendo solução de ligação, durante 24 minutos, para a retirada das proteínas sem afinidade à coluna; foi aplicada a solução de eluição por 10 minutos em um fluxo de 1 mL/min. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 40 minutos (MARTINS *et al.*, 2013).

Todas as cromatografias foram monitoradas por um espectrofotômetro a 280 nm e realizadas em triplicatas. Os cromatogramas foram analisados quanto à área cromatográfica e o número de picos utilizando o software PrimeView 5.0 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

3.4 Dessalinização das amostras fracionadas e liofilização

As amostras dos picos contendo proteínas não ligantes à gelatina (PNLG), PLG, proteínas não ligantes à heparina (PNLH) e PLH foram separadamente homogeneizadas. Posteriormente, aplicaram-se as amostras em um *loop* de 2 mL no FPLC com coluna HiTrapTM Dessalting (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) de 5 mL até que toda a amostra de cada pico fosse totalmente aplicada na coluna. Para a troca de tampão, utilizou-se uma solução 40 mM de bicarbonato de amônia (MARTINS *et al.*, 2013). Em seguida, as amostras foram armazenadas em tubos e mantidas a – 20°C.

As amostras dessalinizadas foram liofilizadas até que estivessem totalmente secas. Para tal processo, utilizou-se um liofilizador (Labconco, MO, USA) a – 55°C e uma pressão atmosférica de 0,035 mBar, por um período de aproximadamente 48 horas.

3.5 Preparação de amostras para espectrometria de massa

As proteínas liofilizadas foram ressuspensas em 50 mM de bicarbonato de amônio e o excesso de sal do tampão anterior foi removido usando filtros Amicon Ultra 10K (Millipore, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram então recuperadas do filtro e reduzidas com 1 mM de DTT durante 10 min a 97°C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se a amostra a bicarbonato de amônio a 50 mM, pH 8, contendo 0,2 µg de tripsina (Promega, Wisconsin, EUA). A reação de tripsina foi realizada “overnight” em uma câmara úmida a 37°C. A reação foi parada pela adição de 1% de ácido trifluoracético à mistura. Em seguida, os peptídeos foram limpos para espectrometria de massa pelo método STAGE-TIP (RAPPSILBER *et al.*, 2003) usando um disco de resina C18 (3M Empore).

3.6 Espectrometria de massa

Todos os experimentos foram realizados em um sistema nano-LC Easy nLC1000 conectado a um espectrometro de massa com quadrupolo - Orbitrap (QExactive) (ThermoElectron, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de íons nanoelectrospray (EasySpray/Thermo). Para a separação por cromatografia líquida, utilizou-se uma coluna EasySpray (C18 de 2 µm, 100 Å, 75 µm de diâmetro interno) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) capilar de comprimento de cama de 25 cm. A taxa de fluxo utilizada foi de 0,3 µL/min e o gradiente de solvente foi de 5% de solução A para 30% de B durante 60 minutos e depois foi realizada uma lavagem com solução B a 90% durante 20 minutos. O solvente A era um ácido fórmico aquoso a 0,1%, enquanto o solvente B era 100% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1%. A temperatura da coluna foi mantida a 60 °C.

O espectrômetro de massa foi operado no modo dependente de dados para alternar automaticamente entre MS e MS/MS. Os espectros de esclarecimento de pesquisa completa (de m/z 400 a 1.200) foram adquiridos no Orbitrap com resolução de $R = 70.000$ em m/z 200 (após acumulação para um alvo de 3.000.000 de íons em quadruplicado). O método utilizado permitiu o isolamento sequencial dos íons de carga múltipla mais intensa, até dez, dependendo da intensidade do sinal para a fragmentação na célula HCD usando dissociação de colisão de alta

energia com um valor alvo de 100.000 cargas ou tempo máximo de aquisição de 100 ms. As varreduras MS/MS foram coletadas na resolução de 17.500 na célula Orbitrap. Os Target íons já selecionados para MS/MS foram excluídos dinamicamente por 30 segundos. As condições gerais de espectrometria de massa foram: a voltagem do eletrospray de 2,1 kV; sem fluxo de gás de bainha e auxiliar, temperatura capilar aquecida de 250 °C, energia de colisão HCD normalizada de 25%. O limite de seleção de íons foi ajustado para 5e4 contagens. Foi utilizada a largura de isolamento de 3,0 Da.

3.7 Identificação e quantificação de proteínas

Os arquivos MS raw foram submetidos à versão do software MaxQuant 1.5.2.8 (COX; MANN, 2008) para identificação de proteínas. Os parâmetros foram definidos da seguinte forma: N-acetilação da proteína e oxidação da metionina como modificações variáveis. A primeira janela de erro de busca de 20 ppm e o erro de busca de rede de 6 ppm a nível MS. A opção tripsina sem prótese de enzima de restrição foi utilizada, com dois erros permitidos. Os peptídeos mínimos únicos foram fixados em 1 e o “False Discovery Rate” (FDR) permitido foi de 0,01 (1%) para a identificação de peptídeos e proteínas. A quantificação das proteínas foi definida com uma janela de alinhamento do tempo de retenção de 3 minutos. Um banco de dados Uniprot foi usado para os seguintes organismos, dependendo da amostra: bovino, caprino, ovinos, coelho, equino ou suíno. A geração de sequências invertidas foi selecionada para atribuir as taxas FDR.

3.8 Ontologia gênica

Os códigos das PLG e PLH obtidos do Uniprot foram analisados através do programa para anotações de proteínas (STRAP), um aplicativo de código-fonte aberto. Os termos da ontologia gênica para os processos biológicos e funções moleculares foram adquiridos do banco de dados UniProtKB (BHATIA *et al.*, 2009).

3.9 Análise das redes de interação das proteínas

As redes de interações entre proteínas foram analisadas por meio do banco de dados STRING 9.0 (<http://string-db.org>), a partir das predições coletadas, baseando-se em associações físicas, de forma direta e funcional e de forma indireta. O programa integrou fontes evidentes, contexto genômico, experimentos em larga escala, co-expressão e os dados obtidos a partir de pesquisas já publicadas. A análise do interactoma foi realizada apenas para as PLG e PLH de maiores intensidades no plasma seminal, baseando-se no percentual de cada proteína obtido através da técnica de espectrometria de massas (SNEL *et al.*, 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Proteínas totais

Os valores das concentrações das proteínas totais encontradas nos plasmas seminais das espécies em estudo variaram entre 17 e 87 mg/mL. Bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos apresentaram, respectivamente, os valores médios de proteínas totais 21, 87, 47, 23, 17 e 30 mg/mL (Tabela 1).

Tabela 1 – Proteínas solúveis totais do plasma seminal em bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos.

Espécie	Concentração (mg/mL)
Bovino	21
Caprino	87
Ovino	47
Coelho	23
Equino	17
Suíno	30

Fonte: dados da pesquisa.

4.2 Cromatografias

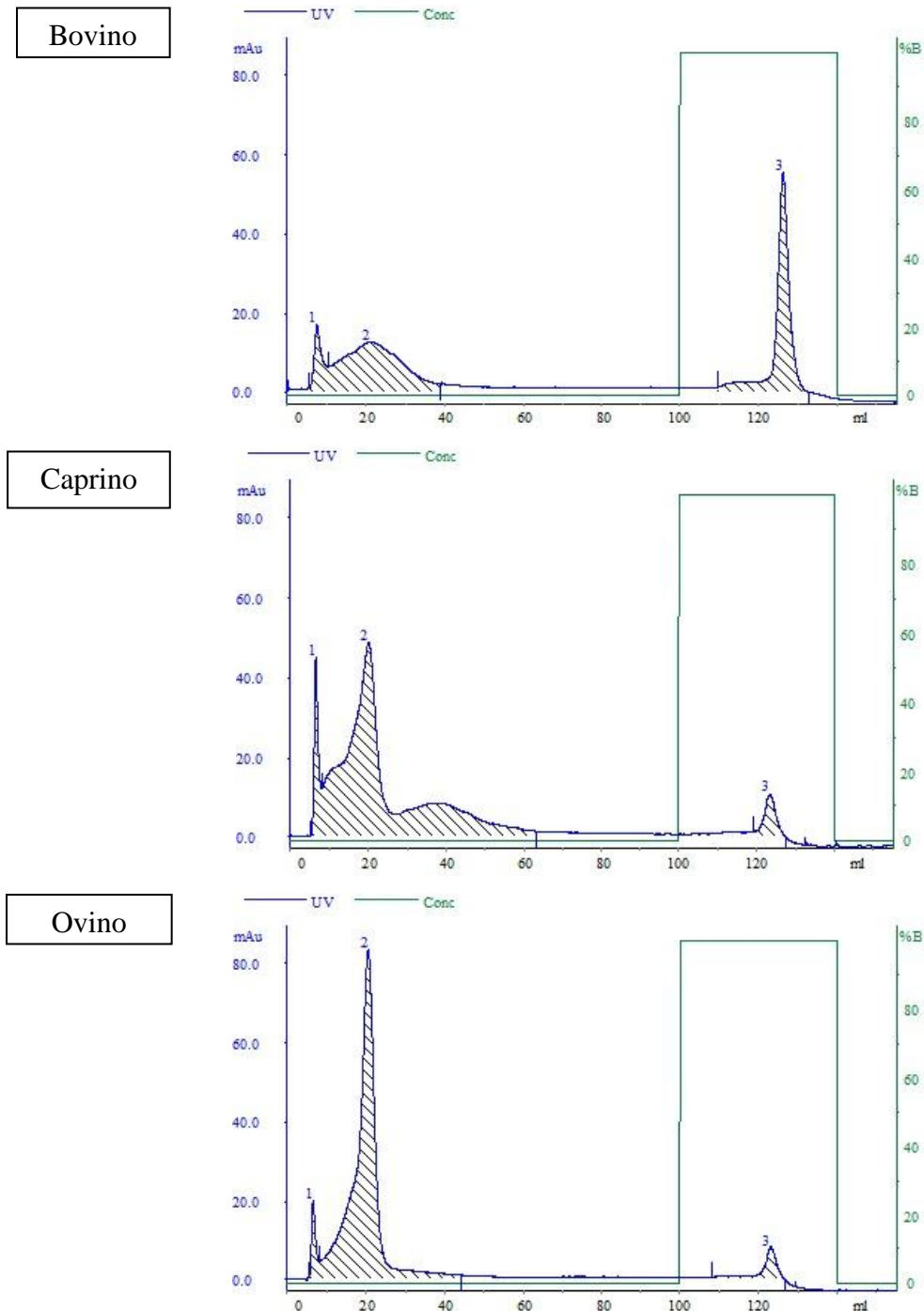
As proteínas seminais fracionadas na coluna de gelatina apresentaram para bovinos, caprinos, ovinos, coelhos e equinos um perfil de três picos cromatográficos (Tabela 2), sendo dois picos sem afinidade (PNLG) e um com afinidade (PLG; Figuras 1 e 2). A espécie com diferente interação das proteínas seminais e a resina de gelatina foi a suína, a qual apresentou apenas dois picos de separação cromatográfica, um pico de PNLG e outro das PLG (Figura 2).

Tabela 2 – Número de picos cromatográficos das proteínas plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos fracionados nas colunas de afinidade contendo as resinas de gelatina e heparina.

Espécie	Número de picos por coluna	
	Gelatina	Heparina
Bovino	3	2
Caprino	3	2
Ovino	3	2
Coelho	3	2
Equino	3	2
Suíno	2	3

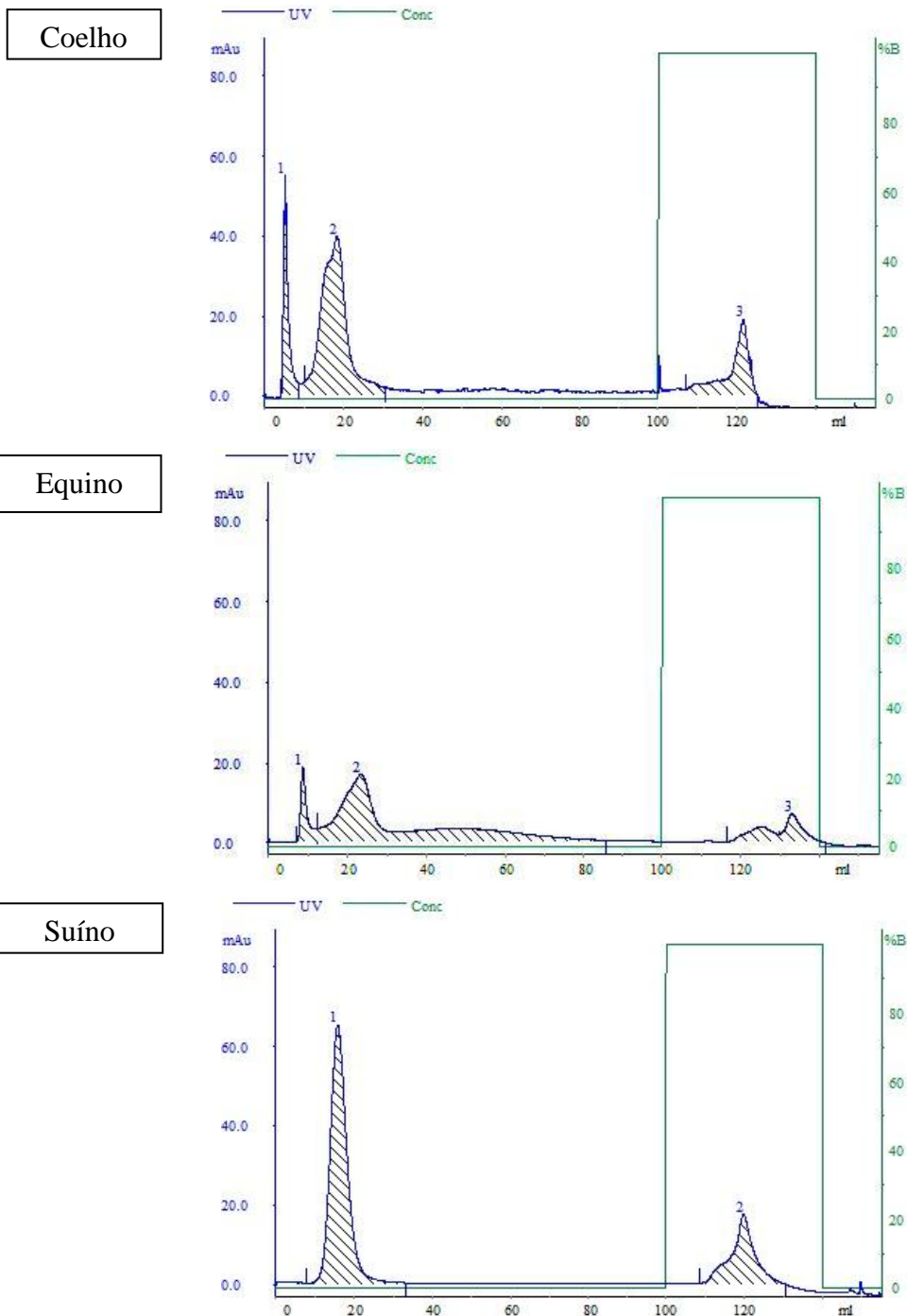
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 1 – Cromatogramas das proteínas com afinidade à gelatina no plasma seminal de ruminantes, onde UV representa a absorvância das proteínas (0-90 mAu), Conc (solução de eluição para a retirada das proteínas de afinidade) e o eixo horizontal o volume de eluição em mL. Números de 1 a 3 representam a quantidade de picos fracionados.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 2 – Cromatogramas das proteínas com afinidade à gelatina no plasma seminal de não ruminantes, onde UV representa a absorvância das proteínas (0-90 mAu), Conc (solução de eluição para a retirada das proteínas de afinidade) e o eixo horizontal o volume de eluição em mL. Números 1 a 3 representam a quantidade de picos fracionados.



Fonte: dados da pesquisa.

Os percentuais das PLG no plasma seminal das espécies foram estão representados na tabela 3. A espécie caprina apresentou a menor concentração de PLG (5,3 %; Figura 1), enquanto a espécie bovina apresentou o maior percentual dessas proteínas (64,9%; Figura 1). Ressalta-se ainda que a espécie ovina deteve a maior quantidade de PNLG, com dois picos sem interação à resina cromatográfica, P1 = 4,9 e P2 = 88,1, totalizando 93% das proteínas sem afinidade (Tabela 3).

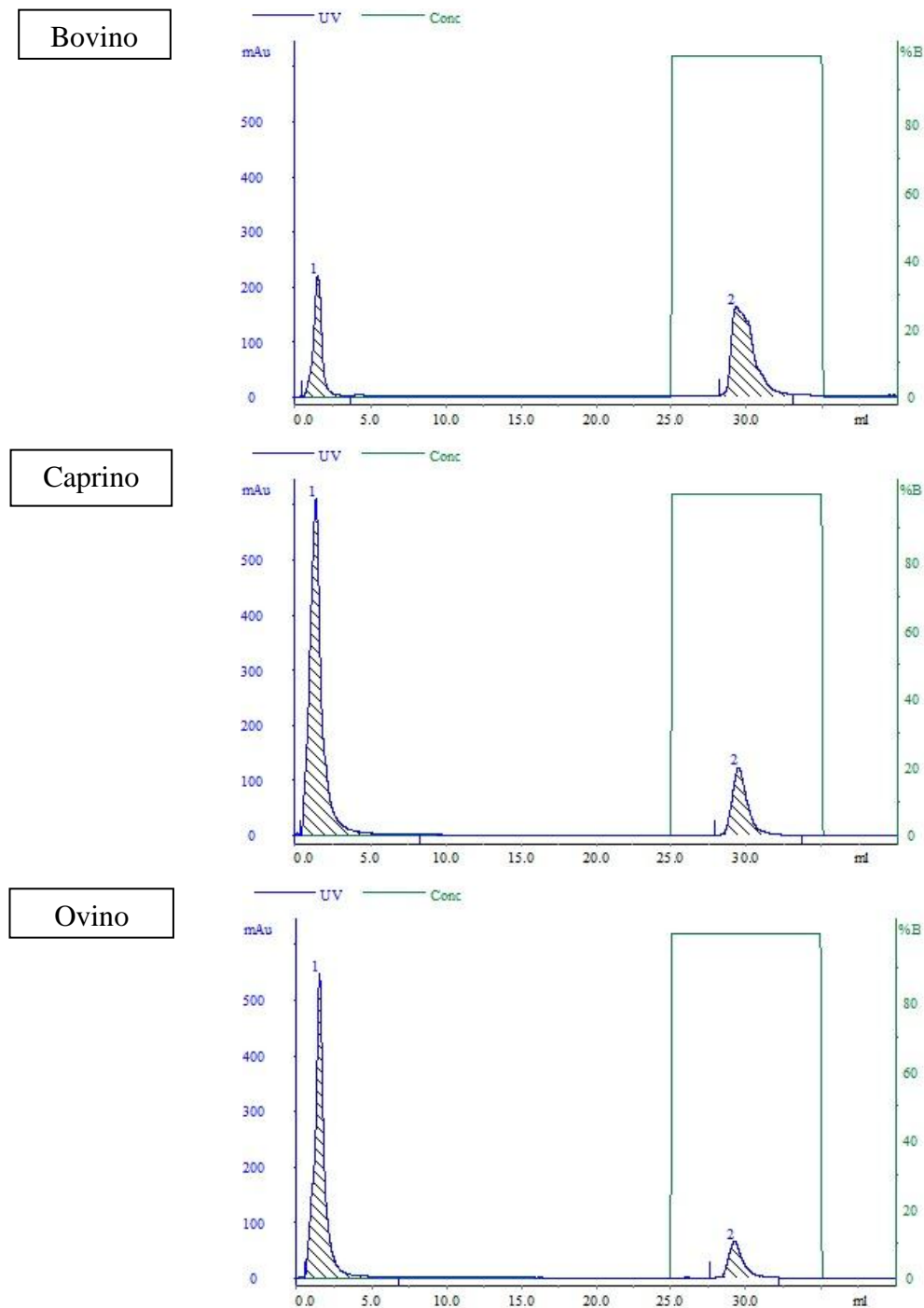
Tabela 3 – Percentual dos picos cromatográficos das proteínas do plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos submetidos à cromatografia de afinidade à gelatina. Para todas as amostras aplicou-se na coluna 3 mg de proteínas.

Espécie	Picos		
	P1	P2	P3
Bovino	20	15	64,9
Caprino	8	86,5	5,3
Ovino	4,9	88,1	6,8
Coelho	15,7	62,3	21,8
Equino	8,4	74,4	16,8
Suíno	73,1	26,8	-

Fonte: dados da pesquisa.

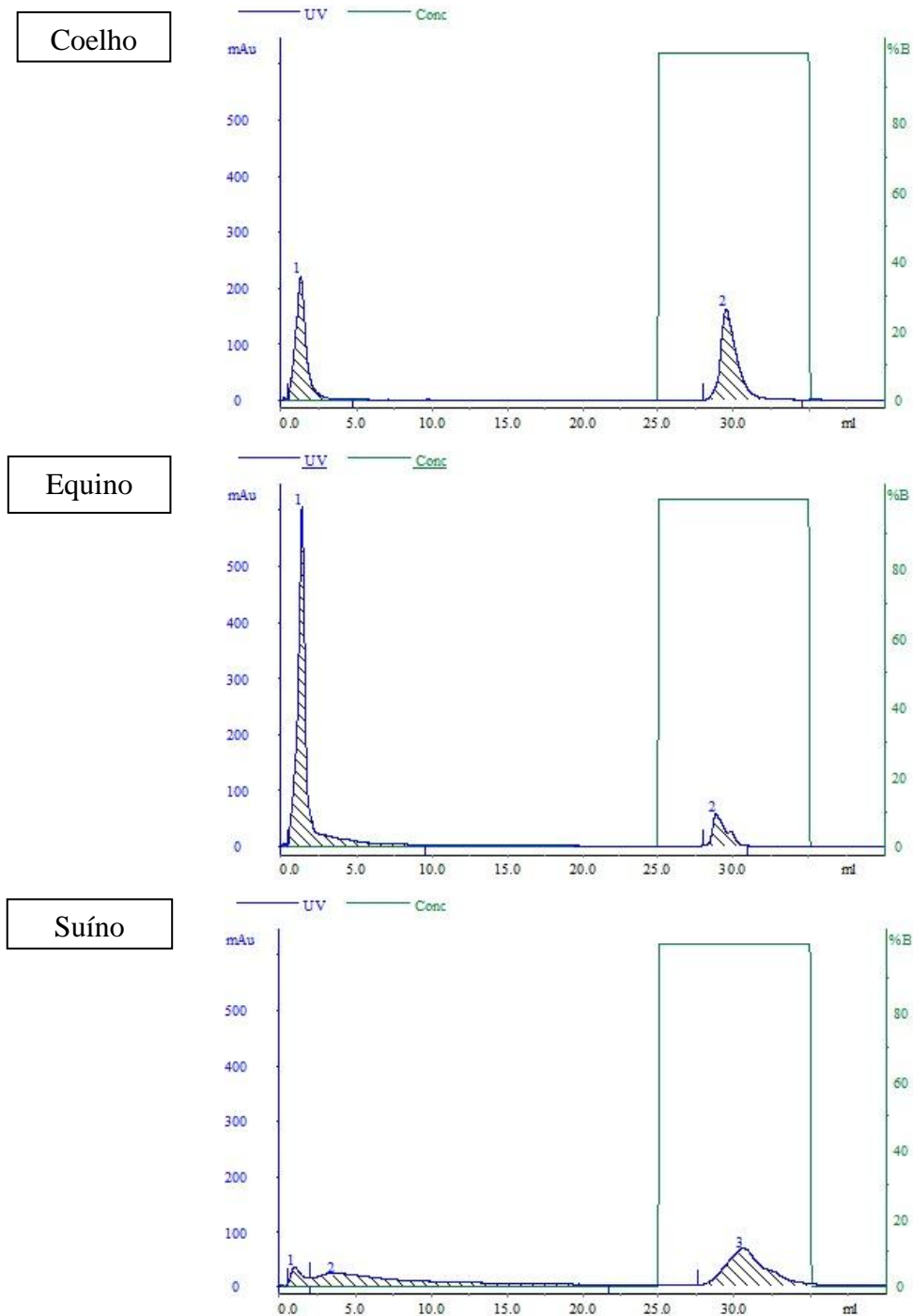
Já o plasma seminal fracionado na cromatografia de afinidade à heparina, apresentou um perfil cromatográfico de dois picos em cinco espécies (Figuras 3 e 4), a exceção mais uma vez foi na espécie suína que demonstrou três picos de separação (Figura 4).

Figura 3 – Cromatogramas das proteínas com afinidade à heparina no plasma seminal de ruminantes, onde UV representa a absorvância das proteínas (0-650 mAu), Conc (solução de eluição para a retirada das proteínas de afinidade) e o eixo horizontal o volume de eluição. Números 1 e 2 representam a quantidade de picos fracionados.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 4 – Cromatogramas das proteínas com afinidade à heparina no plasma seminal de não ruminantes, onde UV representa a absorvância das proteínas (0-650 mAu), Conc (solução de eluição para a retirada das proteínas de afinidade) e o eixo horizontal o volume de eluição. Números 1 e 3 representam a quantidade de picos fracionados.



Fonte: dados da pesquisa.

Bovinos apresentaram um maior percentual de proteínas não ligantes (PNLH = 64,7%) que as ligantes (PLH = 35,3%). Caprinos e ovinos detiveram percentuais de PLH baixos comparando ao material não retido, 20,4 e 15,9%, respectivamente (Tabela 4). Coelhos demonstraram uma similaridade entre as quantidades de proteínas plasmáticas retidas (46,9%) e não retidas (53%). Cavalos apresentaram um perfil cromatográfico de afinidade à heparina similar aos caprinos e ovinos, detendo também pouca quantidade de PLH (13,5%; Figura 4). Suínos tiveram três picos de separação, sendo dois de PNLH (7 e 43,1%) e um de PLH (49,7%).

Tabela 4 – Amplitude máxima atingida e volume médio de retenção dos picos cromatográficos do plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos, contendo 3 mg de proteínas, submetidos a cromatografia de afinidade à heparina.

Espécie	Picos		
	P1	P2	P3
Bovino	64,7	35,3	-
Caprino	79,5	20,4	-
Ovino	84	15,9	-
Coelho	46,9	53	-
Equino	86,4	13,5	-
Suíno	7	43,1	49,7

Fonte: dados da pesquisa.

4.3 Identidade das proteínas

4.3.1 Perfil das proteínas de ligação à gelatina

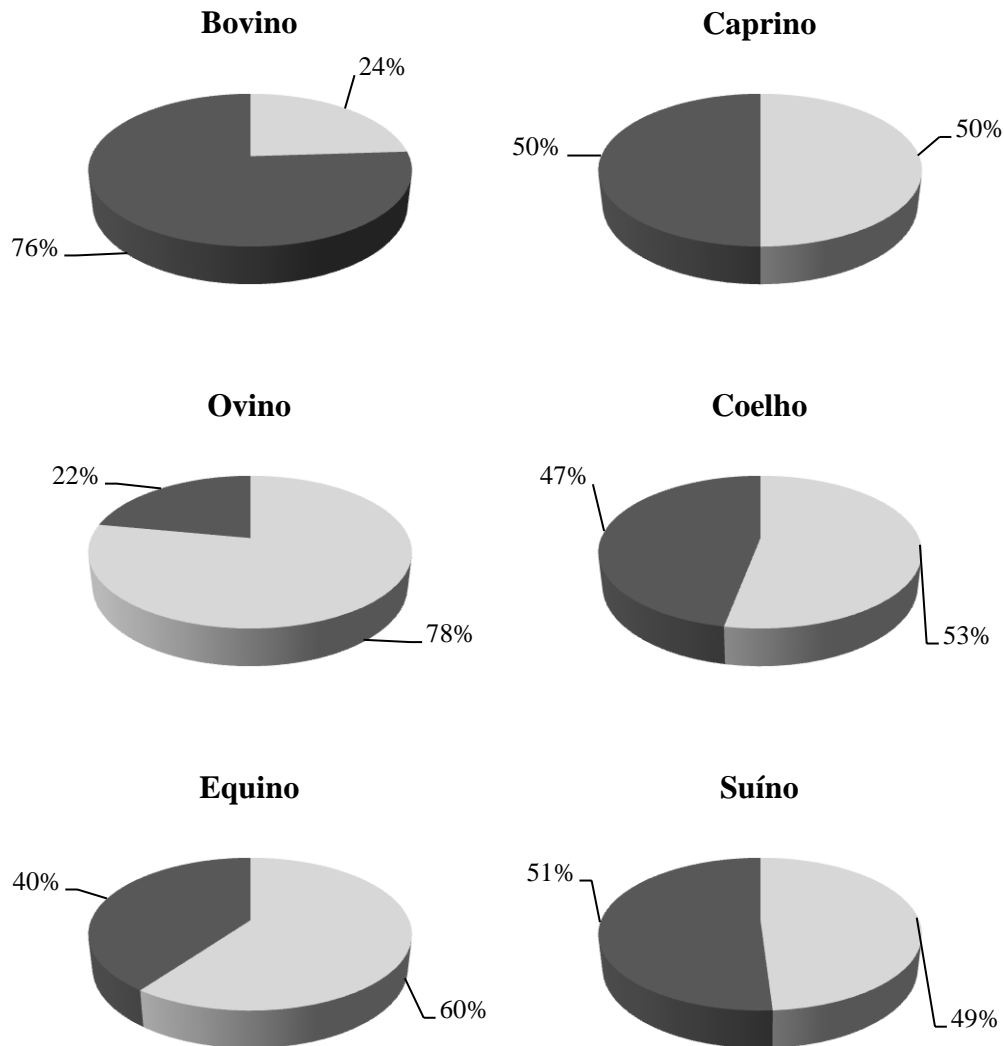
Através da espectrometria de massas, identificaram-se diferentes quantidades de PNLG e PLG foram identificadas no plasma seminal das espécies domésticas, conforme a tabela 5. As espécies ruminantes apresentaram o maior número de PLG e a espécie bovina deteve o maior número dessas proteínas (354 proteínas).

Tabela 5 – Quantidade de proteínas do plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos, caracterizadas e não caracterizadas identificadas em cada pico na coluna de gelatina.

Espécies	P1	P2	P3
Bovinos	129	356	354
Caprinos	644	584	103
Ovinos	380	631	51
Coelhos	723	541	146
Equinos	155	23	25
Suínos	44	87	-

Dentre as PLG, as moléculas caracterizadas pelos bancos de dados do UniProt representaram em cada espécie um total em: bovinos (76%), caprinos (50%), ovinos (22%), coelhos (47%), equinos (40%) e suínos (51%), conforme a Figura 5.

Figura 5 – Percentuais das proteínas de ligação à gelatina do plasma seminal caracterizadas (cinza) e não caracterizadas (branco) em bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos.



Fonte: dados da pesquisa.

A identidade das proteínas mais abundantes de afinidade à gelatina e heparina do plasma seminal nas seis espécies estudadas pode ser visualizada na tabela 6. As PLG com maiores concentrações no plasma seminal de bovinos foram as espermadesina 1 (18,11%) e a espermadesina Z13 (7,19%), em caprinos a bodesina 2 (19,44%) e a hialuronidase (9,17%), nos ovinos a peptidil prolil cis-trans isomerase (33,75%) e a proteasomo subunidade tipo alpha (8,20%). Já nas espécies não-ruminantes foram as anexina (31,24%) e glectina (12,64%) no

plasma seminal de coelhos, proteína secretória rica em cisteína 3 (16,13%) e lactotransferrina (4,25%) em equinos e as proteínas de ligação à carbohidrato AQN-3 (21,88%) e AWN (10,90%) em suínos.

Tabela 6 – Concentrações das proteínas de ligação à gelatina (PLG) e heparina (PLH) mais abundantes identificadas no plasma seminal de animais de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos.

Espécie	Classificação quanto à afinidade	Nome da proteína	Código de acesso no uniprot	Gene secretor	Concentração da proteína (%)
Bovino	PLG	Eapermadesina 1	P29392	SPADH1	21,84
	PLG	Espermadesina Z13	P82292	spadh2	7,19
	PLG	Secretoglobina membro da família 1D	A0JNP2	SCGB1D	6,51
	PLG	Proteína SCGB2A2	A6QPK0	SCGB2A2	6,02
	PLH	C-C motif qumiocina 2	P28291	CCL2	23,35
	PLH	Caltrina	P06833	PYY2	8,18
	PLH	Espermadesina 1	P29392	SPADH1	7,85
	PLH	Clusterina	P17697	CLU	4,46
Caprino	PLG	Bodesina 2	A1Z181	Bdh-2	19,44
	PLG	Hialuronidase	W5NSU1	LOC101107188	9,17
	PLG	Inibitor de metallopeptidase 2	C8BKC3	TIMP2	7,59
	PLG	Clusterina	W5PZI1	LOC101113728	5,10
	PLH	Bodesina 2	A1Z181	Bdh-2	31,42
	PLH	Clusterina	W5PZI1	LOC101113728	5,51
	PLH	Beta-hexosaminidase	W5P3C6	HEXB	2,87
	PLH	Proteína serpina 2	G1DGI1	SERPINE2	2,81
	PLG	Peptidil prolil cis-trans isomerase B	W5QHU9	PPIB	33,75
	PLG	Proteosomo	W5QD30	PSMA5	8,20

Ovino		subunidade alpha tipo 2			
	PLG	Proteína S100	W5QIV1	S100A11	1,34
	PLG	Tetraspanina	W5PYR6	TSPAN8	1,29
	PLH	Sorbitol	W5QIT0	SORD	11,91
		desidrogenase			
	PLH	Proteína S100	W5QIV1	S100A11	1,45
	PLH	Fosfolipideo transportados de ATPase	W5PKM1	ATP11C	1,44
	PLH	Fosfoinositide Fosfolipase C	W5QH40	PLCZ1	0,94
Coelho	PLG	Anexina	G1TED6	ANXA5	31,24
	PLG	Galectina	G1TPZ1	LGALS1	12,64
	PLG	Uteroglobina	P02779	SCGB1A1	3,08
	PLG	Glicoproteína ácida alpha 1	P25227	ORM1	1,55
	PLH	Anexina	G1TED6	ANXA5	44,77
	PLH	Ubiquitina	P62975	N/A	1,61
	PLH	Galectina	G1TPZ1	LGALS1	1,41
	PLH	Tetraspanina	G1SYM3	CD9	1,25
	PLG	Proteína secretória rica em cisteína 3	O19010	CRISP3	16,13
Equino	PLG	Lactotransferrina	O77811	LTF	4,25
	PLG	Calicreína-1E2	Q6H321	KLK1E2	2,32
	PLG	Clusterina	Q29482	CLU	1,16
	PLH	Proteína de ligação a carboidratos AWN	P80720	N/A	50,05
	PLH	Lactotransferrina	O77811	LTF	4,72
	PLH	Clusterina	Q29482	CLU	1,56
	PLH	Fibronectina 1	F7CN11	FN1	1,63
Suíno	PLG	Proteína de ligação a carboidratos AQN-3	P24020	AQN-3	21,88
	PLG	Proteína de ligação a carboidratos AWN	P26776	N/A	10,90
	PLG	Glicoproteína mais abundante do plasma seminal PSP-I	P35495	PSP-I	9,76
	PLG	Espermadesina	Q4R0H3	AQN-1	4,74

PLH	AQN-1 Glicoproteína mais abundante do plasma PSP-I	P35495	PSP-I	79,58
PLH	Proteína de ligação a carboidratos	P24020	AQN-3	5,15
PLH	AQN-3 Glicoproteína mais abundante do plasma PSP- II	P35496	PSP-II	3,02
PLH	Espermadesina AQN-1	Q4R0H3	AQN-1	0,93

Fonte: dados da pesquisa.

4.3.2 Perfil das proteínas de ligação à heparina

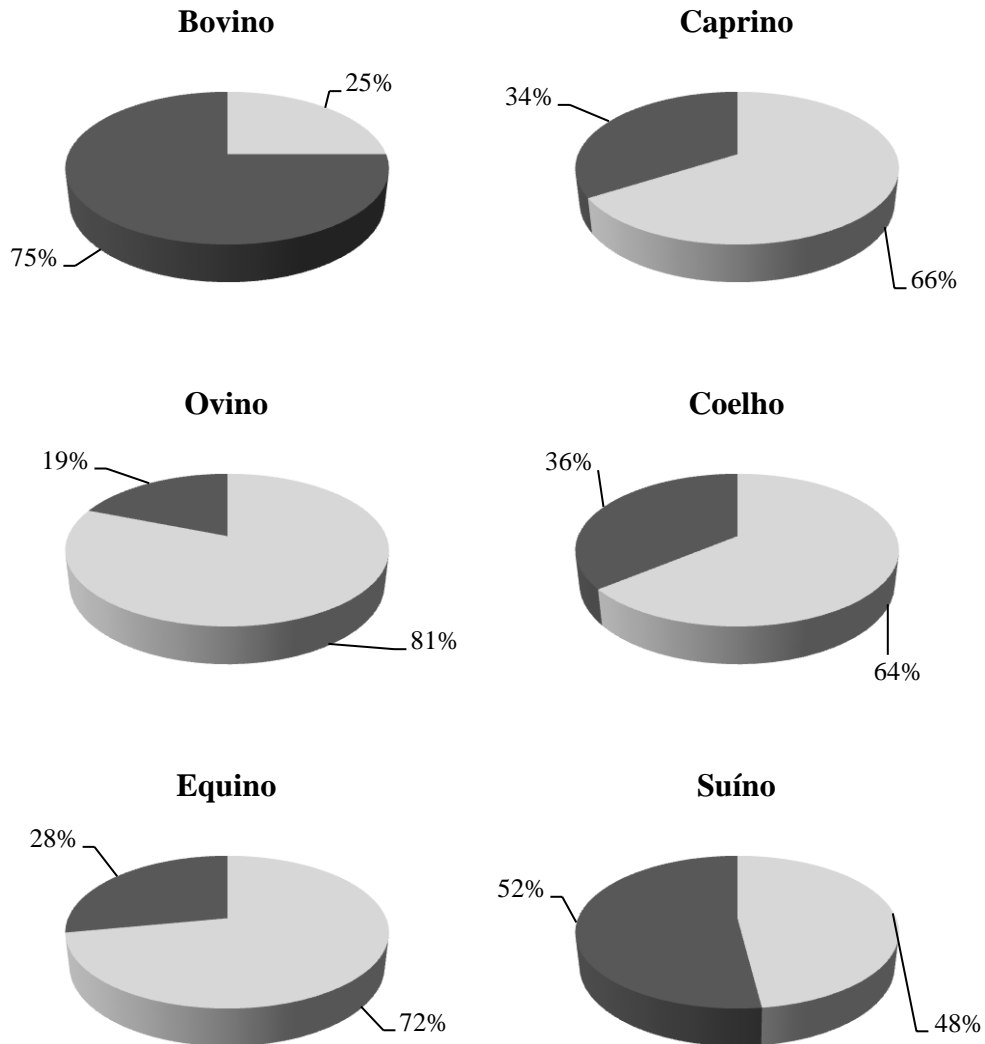
O total das PNLH e PLH identificada no plasma seminal da seis espécies estudadas podem ser visualizadas na tabela 7. Os animais ruminantes apresentam o maior número de PLH e a espécie bovina deteve o maior número dessa classe de proteínas. Dentre as PLH identificadas no presente estudo, as moléculas caracterizadas representam um total em: bovinos (75%), caprinos (34%), ovinos (19%), coelhos (36%), equinos (28%) e suínos (52%), conforme a figura 6.

Tabela 7 – Quantidade de proteínas do plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, equinos e suínos, caracterizadas e não caracterizadas, identificadas em cada pico na coluna de heparina.

Espécies	P1	P2	P3
Bovinos	503	894	-
Caprinos	405	789	-
Ovinos	618	647	-
Coelhos	330	600	-
Equinos	81	556	-
Suínos	154	158	86

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 6 – Percentuais das proteínas de ligação à heparina do plasma seminal caracterizadas (cinza) e não caracterizadas (branco) em bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos.



Fonte: dados da pesquisa.

As PLH com maiores concentrações identificadas nos ruminantes foram as C-C motif quimiocina 2 (23,35%) e a caltrina (8,18%) nos bovinos, a bodesina 2 (31,42%) e clusterina (5,51%) em caprinos, sorbitol desidrogenase (11,91%) e a proteína S100 (1,45%) nos ovinos (Tabela 6).

Em não-ruminantes foram as PLH com maior abundância, as anexina (44,77%) e ubiquitina (1,61%) em coelhos, proteína de ligação a carboidrato AWN (50,05%) e

lactotransferrina (4,72%) em equinos, glicoproteína mais abundante do plasma seminal PSP-I (79,58%) e proteína de ligação a carboidrato AQN-3 (5,15%) na espécie suína (Tabela 6).

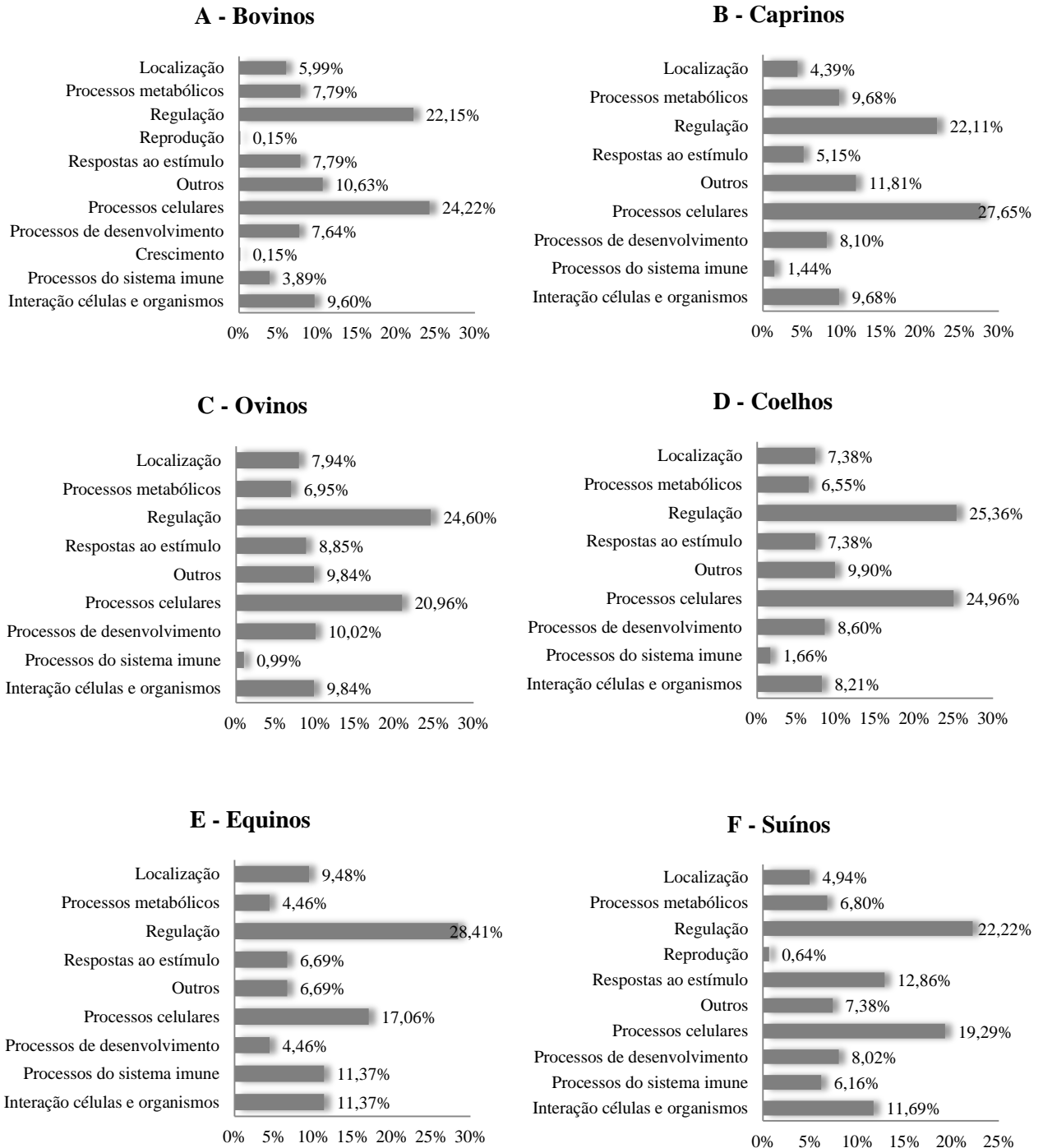
4.4 Ontologia gênica das proteínas de afinidade à gelatina

Através da ontologia gênica, identificaram-se os principais processos biológicos e funções moleculares nos quais as PLG e PLH estão envolvidas em cada espécie (Figuras 7, 8, 9 e 10). Desta forma, as PLG em sua maioria, atuam, principalmente, nos processos biológicos celulares e de regulação (Figura 7). As principais funções moleculares que as PLG atuam são de ligação e atividade catalítica (Figura 8).

4.5 Ontologia gênica das proteínas de afinidade à heparina

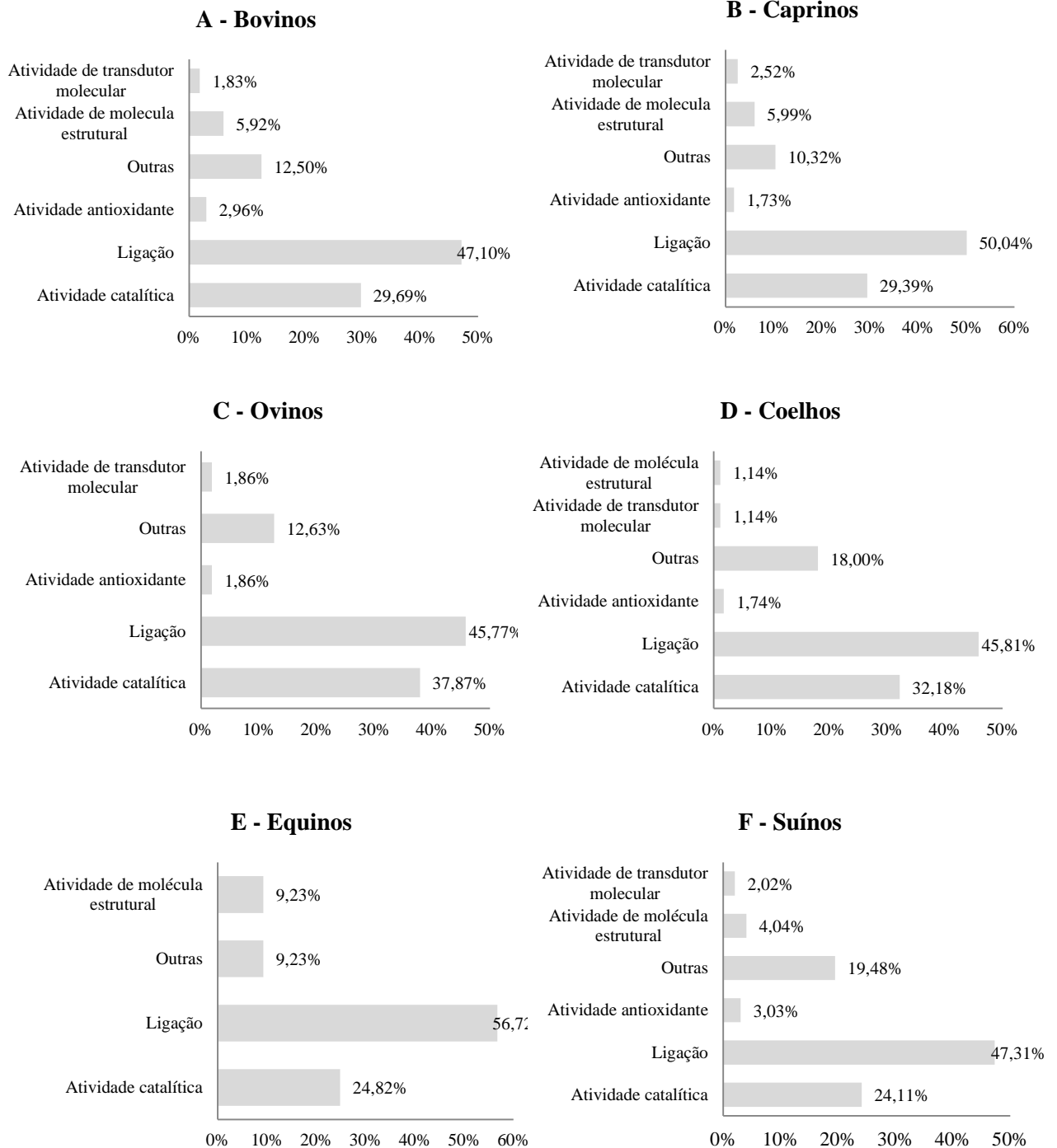
As PLH identificadas também atuam, principalmente, nos processos biológicos celulares e nos processos de regulação (Figura 9). As funções moleculares mais importantes das PLH identificadas foram as de ligação e atividade catalítica (Figura 10).

Figura 7 – Gráficos das anotações da ontologia gênica dos processos biológicos os quais apresentam as proteínas de ligação à gelatina no plasma seminal de bovinos (A), caprinos (B), ovinos (C), coelhos (D), equinos (E) e suínos (F) estão envolvidas. As proteínas identificadas por espectrometria de massas foram analisadas no programa STRAP. Os termos da ontologia gênica foram obtidos no banco de dados UniProtKB.



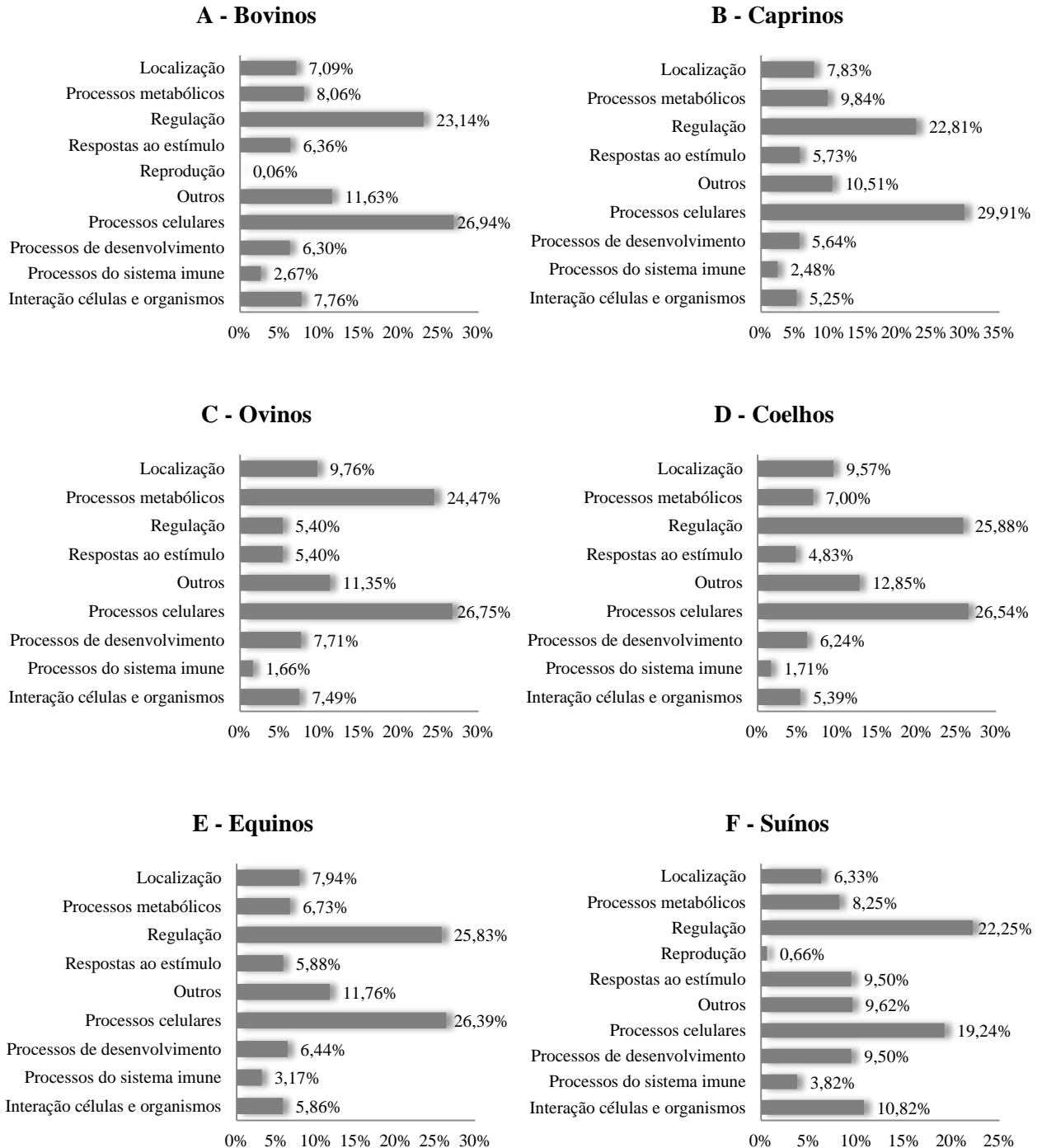
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 8 – Gráficos das anotações da ontologia gênica das funções moleculares as quais apresentam as proteínas de ligação à gelatina no plasma seminal de bovinos (A), caprinos (B), ovinos (C), coelhos (D), equinos (E) e suínos (F) estão envolvidas. As proteínas identificadas por espectrometria de massas foram analisadas no programa STRAP. Os termos da ontologia gênica foram obtidos no banco de dados UniProtKB.



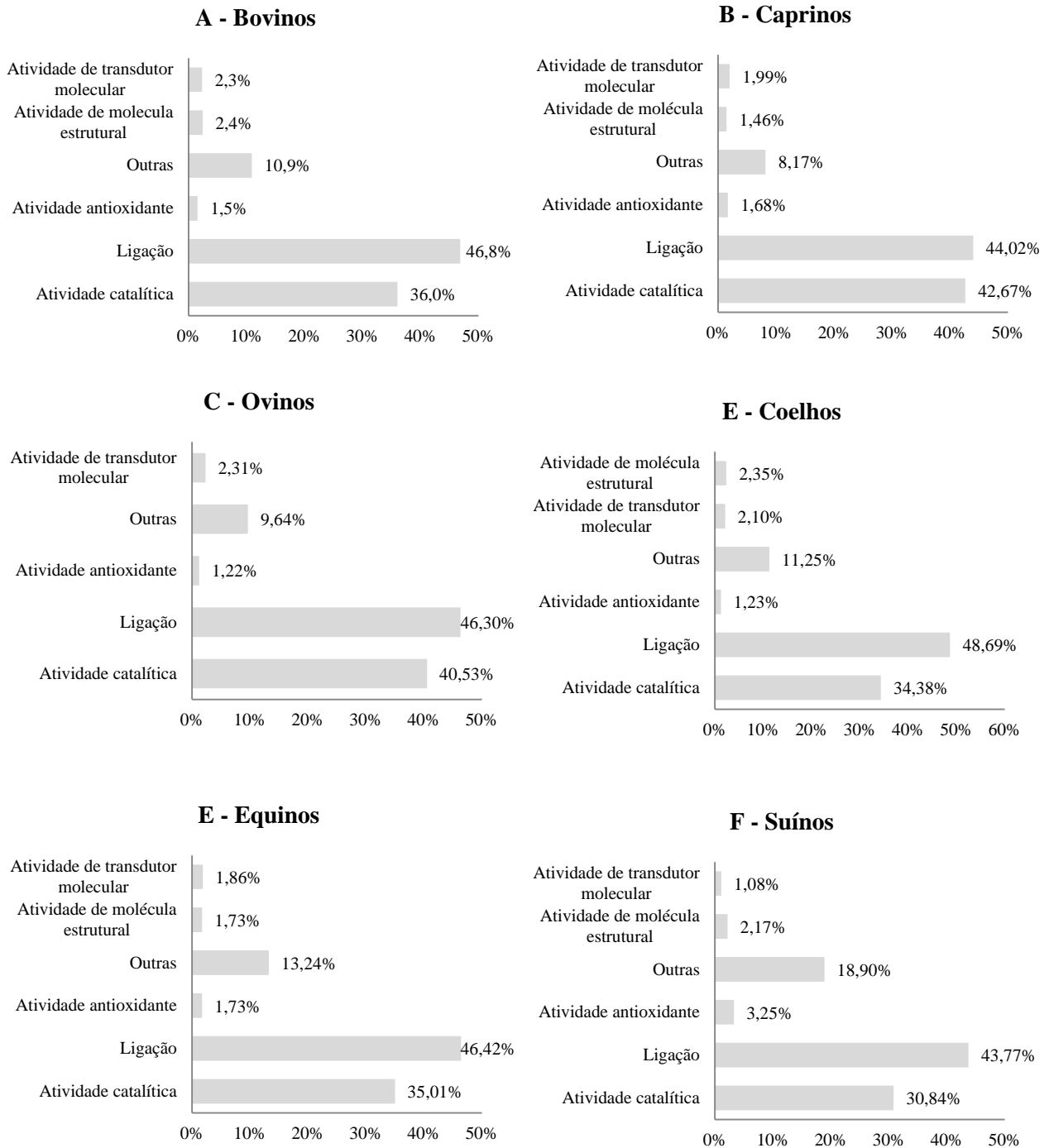
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 9 – Gráficos das anotações da ontologia gênica dos processos biológicos os quais apresentam as proteínas de ligação à heparina no plasma seminal de bovinos (A), caprinos (B), ovinos (C), coelhos (D), equinos (E) e suínos (F) estão envolvidas. As proteínas identificadas por espectrometria de massas foram analisadas no programa STRAP. Os termos da ontologia gênica foram obtidos no banco de dados UniProtKB.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 10 – Gráficos das anotações da ontologia gênica das funções moleculares as quais apresentam as proteínas de ligação à heparina no plasma seminal de bovinos (A), caprinos (B), ovinos (C), coelhos (D), equinos (E) e suínos (F) estão envolvidas. As proteínas identificadas por espectrometria de massas foram analisadas no programa STRAP. Os termos da ontologia gênica foram obtidos no banco de dados UniProtKB.



Fonte: dados da pesquisa.

4.6 Análise do interactoma

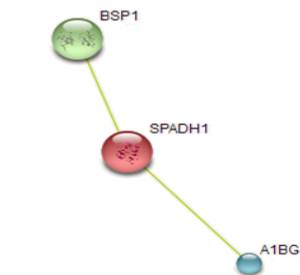
4.6.1 *Interactoma das proteínas de ligação à gelatina nas espécies ruminantes*

Os interactomas de algumas das PLG e PLH expressas em maiores quantidades no plasma seminal dos animais ruminantes podem ser visualizados nas figuras 11, 12, 13 e 14. As proteínas foram analisadas com o software STRING. Dentre as PLG abundantes em bovinos, a análise do interactoma da espermadesina 1 (SPADH1) mostrou que esta proteína interage com a glicoproteína alpha 1B (A1GB) e a “bind sperm of protein 1” (PDC-109; BSP1) (Figura 11). Outra PLG abundante no plasma seminal de bovinos, a secretoglobina membro da família 1D (SCGB1D) interage, principalmente, com uma proteína ligadora de calmodulina (CALML5) e ligantes androgênicos e esteroides, como a LIPA e a LIPC (Figura 11).

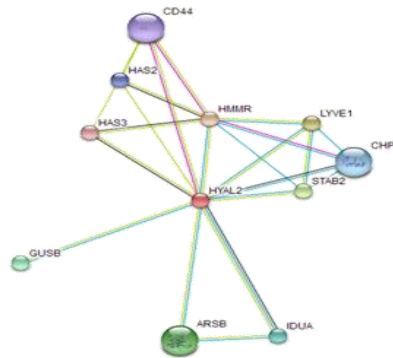
Em caprinos, a PLG hialuronidase (HYAL2) interage com enzimas (HAS2 e HAS3), macromoléculas ligadoras de cálcio (CHP), receptores do ácido hialurônico (LYVE1 e CD44), entre outras proteínas (Figura 11). Enquanto que a inibidor de metalopeptidase 2 (TIMP2) interage com proteínas, na sua maioria, da mesma família das metalopeptidases (MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP13, MMP14, MMP15 e MMP16) que são moléculas de ligação ao íon metálico zinco (Figura 11).

Nos ovinos, as redes de interações envolvendo a peptidil prolil cis-trans isomerase B (PPIB) incluem proteínas membros da família do colágeno, como as COL1A1 e COL1A2 e as que se ligam ao colágeno como a SERPINH1 (Figura 11). Já a proteasomo subunit alpha tipo 2 tem interações apenas com proteases catalíticas, membros da mesma família (Figura 11).

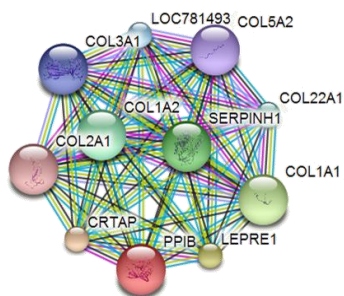
Figura 11 – Análise in silico das proteínas de ligação à gelatina mais abundante do plasma seminal de bovinos, caprinos e ovinos. Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação: (—) banco de dados, (—) determinado experimentalmente, (—) genes próximos, (—) fusão entre genes, (—) co-ocorrência de genes, (—) *textmining*; (—) co-expressão e (—) homologia protéica. Espermedesina 1 (SPDH1), secretoglobulina membro da família 1D (SCGB1D), hialuronidase (HYAL2), inibidor de metalopeptidase 2 (TIMP2), peptidil prolil cis-trans isomerase (ENSBTAG00000008359) e proteossome alpha subunidade tipo 2 (PSMA2).



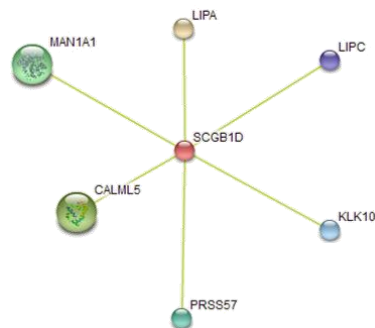
Hialuronidase (Caprino)



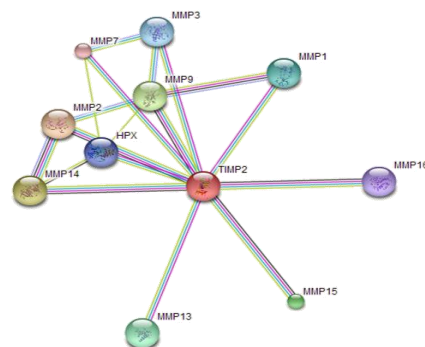
Peptidil prolil cis-trans isomerase B (Ovino)



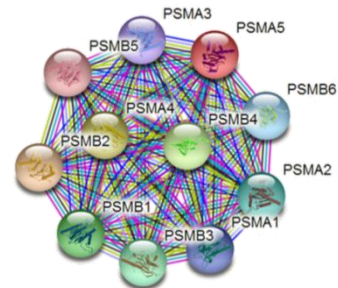
Secretoglobulina membro da família 1D (Bovino)



Inibidor de metalopeptidase 2 (Caprino)



Proteossomo subunidade alpha tipo 2 (Ovino)



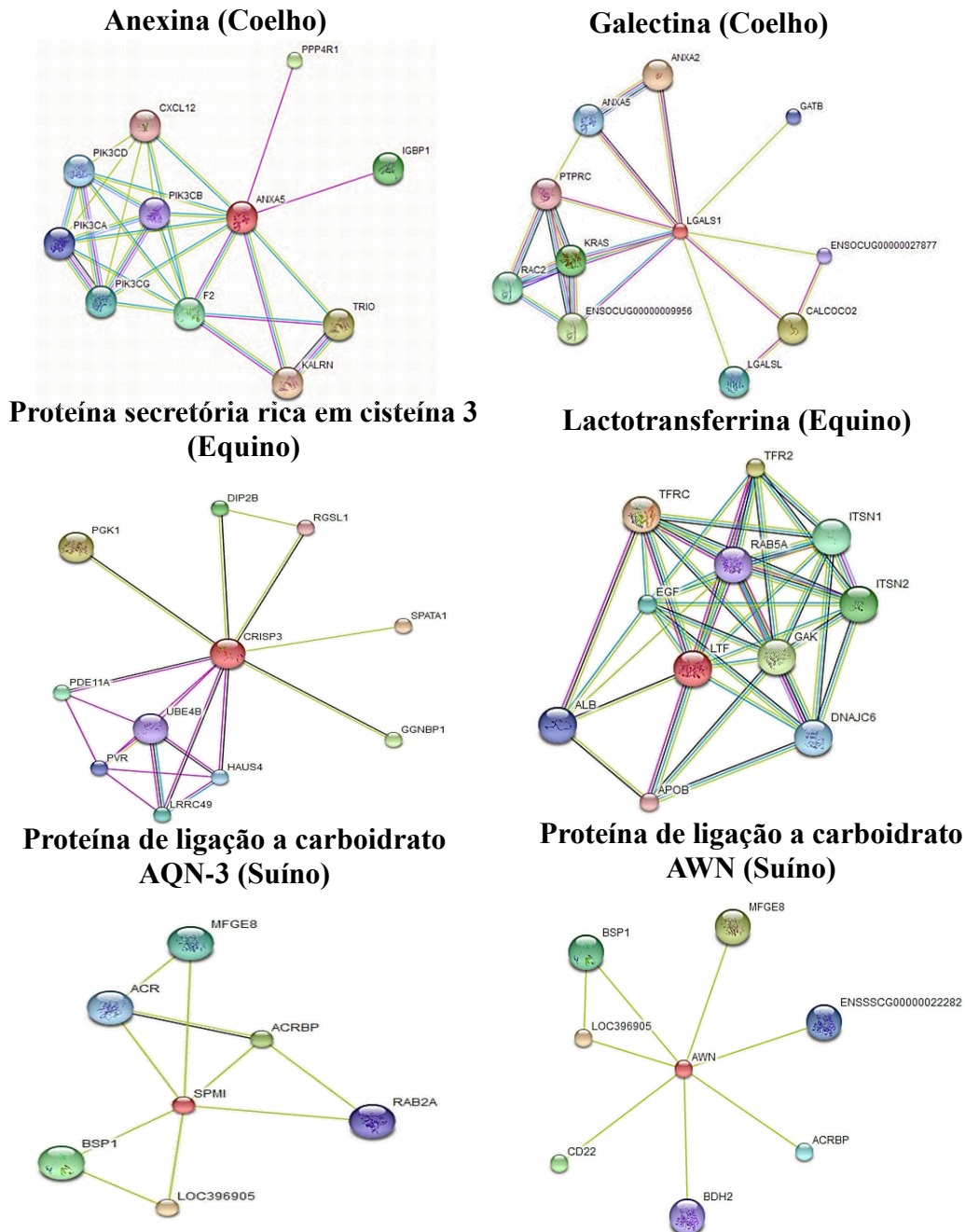
4.6.2 Interactoma das proteínas de ligação à gelatina nas espécies não-ruminantes

A rede de interação da PLG mais abundante do plasma seminal de coelhos, a anexina (ANXA5), inclui interação com fator de coagulação (F2), moléculas envolvidas regulação negativa da rota metabólica para sinalização de apoptose (IGBP1), na ligação a molécula de ATP (TRIO), atividade da proteína kinase (PIK3CB) e outras proteínas com importantes funções (Figura 12). Já a galectina (LGALS1) interage com as ANXA2 e ANXA5, moléculas dependentes de cálcio (Figura 12).

Em equinos, a proteína de ligação a carboidrato 3 (CRISP3) interage com o co-factor da polimerase alpha (PGK1), enzima de ligação (UBE4B), proteína com atividade catalítica (DISP2B) e com a fosfodiesterase (PDE11A), conforme figura 12. A lactotransferrina (LTF) tem interação com precursor sérico de albumina (ALB), proteína receptora de transferrina 1 (TFRC), dentre outras (Figura 12).

Já no plasma seminal de suínos, a PLG mais abundante, a proteína de ligação a carboidrato AQN-3 e AWN (Figura 12), interage, principalmente, com a proteína do plasma seminal bP1 (BSP1), a inibidor de acrosina associado ao espermatozoide (LOC39905), com a proteína de ligação à acrosina (ACRBP) e a lactadherin (MFGE8).

Figura 12 – Análise *in silico* das proteínas de ligação à gelatina mais abundante do plasma seminal de coelhos, equinos e suínos. Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação: (—) banco de dados, (—) determinado experimentalmente, (—) genes próximos, (—) fusão entre genes, (—) co-ocorrência de genes, (—) *textmining*; (—) co-expressão e (—) homologia protéica. Anexina (ANXA5), galectina (LGALS1), proteína secretória rica em cisteína 3 (CRISP3), lactotransferrina (LTF), proteína de ligação a carboidrato AQN-3 (SPMI) e AWN (AWN).



Fonte: Software String.

4.6.3 Interactoma das proteínas de ligação à heparina nas espécies ruminantes

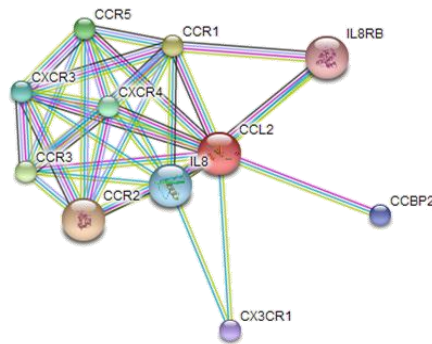
Em bovinos, a PLH C-C motif quimiocina 2 (CCL2) interage com a interleukin-8 (IL8) e com seu receptor (IL8RB), essa molécula também relaciona-se com os ligantes e receptores de C-C quimiocinas (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3, CXCR4, CX3CR1, CCPB2) como observa-se na figura 13. Enquanto a PLH caltrin (PYY2) interage com as BSP1 e BSP3 (Figura 13).

No plasma seminal de caprinos, a bodesina 2 (ENSBTAG00000038684) interage com uma proteína ainda não totalmente caracterizada (LOC777593), conforme figura 13. A clusterina (CLU) possui em sua rede de interação uma ampla gama de proteínas (Figura 13), as quais incluem biomoléculas inibidoras de serina proteases (SERPINA1, SERPINE1 e SERPINF2), inibidor de metaloproteínases (TIMP1), serum albumina (ALB), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1), a alpha actina (ACTN4) e as alpha e beta glicoproteínas (AHSG e APOH).

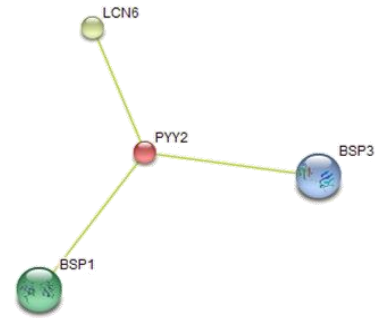
Nos ovinos, a sorbitol desidrogenase (SORD) relaciona-se com a L-xilulose redutase (ENSBTAG00000008747), com proteínas catalíticas (AKR1B1 e AKR1B10), biomoléculas da família das hexokinases (HK1, HK2, HKCD1 e KHK) e a catalase (CAT), conforme Figura 13. A protein S100 (S100A11) possui em sua rede de interação as anexinas (ANEXA1, ANEXA2 ANEXA6, ANEXA11 e ENSBTAG00000005585), inibidor de metalopeptidases (TIMP1) e a proteína S100-A12, membra da mesma família (Figura 13F).

Figura 13 – Análise *in silico* das proteínas de ligação à heparina mais abundante do plasma seminal de bovinos, caprinos e ovinos. Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação: (—) banco de dados, (—) determinado experimentalmente, (—) genes próximos, (—) fusão entre genes, (—) co-ocorrência de genes, (—) *textmining*; (—) co-expressão e (—) homologia protéica. C-C motif chemokine 2 (CCL2), caltrina (PYY2), bodhesin-2 (ENSBTAG00000038684), clusterin (CLU), sorbitol dehidrogenase (SORD), protein S100 (S100A11).

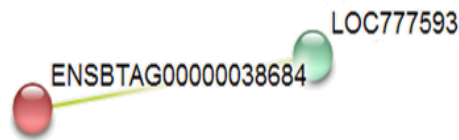
C-C motif quimiocina 2 (Bovino)



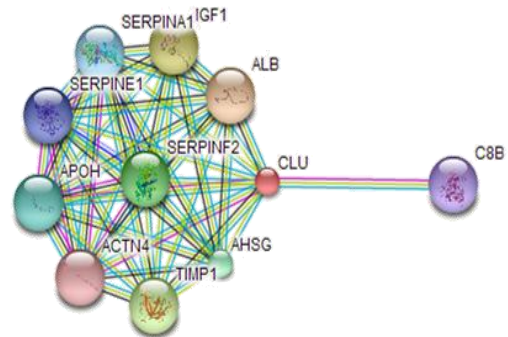
Caltrina (Bovino)



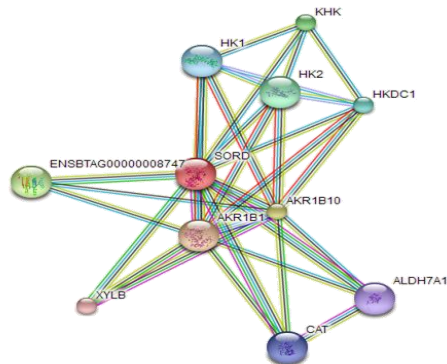
Bodesina 2 (Caprino)



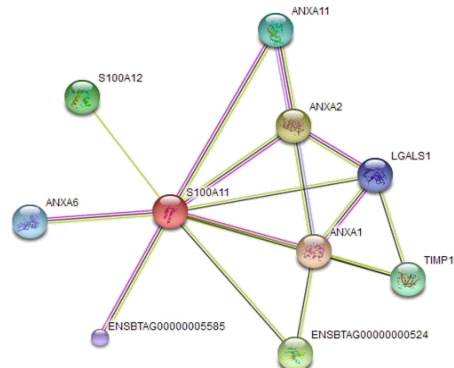
Clusterina (Caprino)



Sorbitol desidrogenase (Ovino)



Proteína S100 (Ovino)



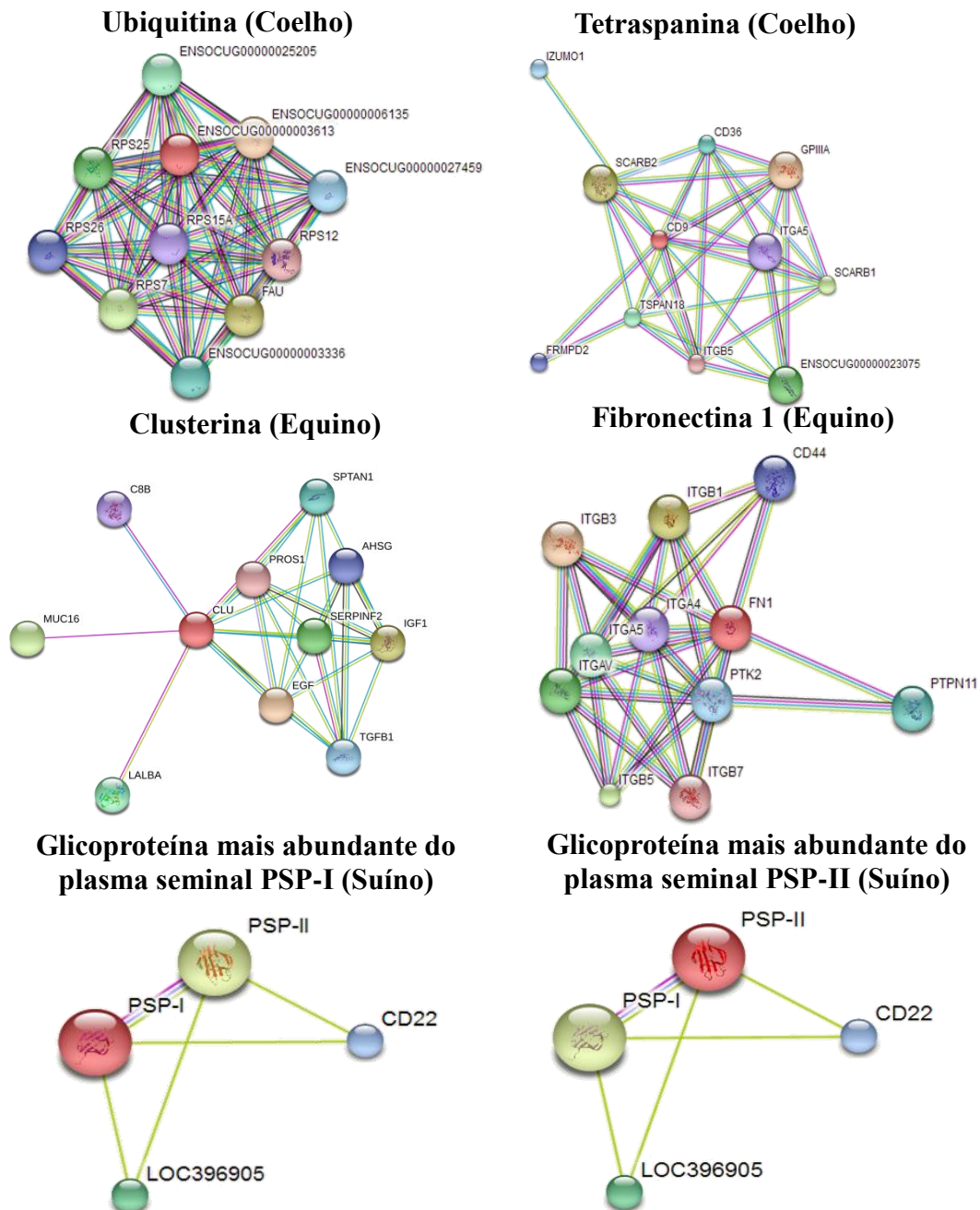
4.6.4 Interactoma das proteínas de ligação à heparina das espécies não-ruminantes

A PLH mais abundante do plasma seminal de coelhos também é a anexina, entretanto outras PLH de maiores concentrações têm seus interactomas descritos na figura. Uma destas é a ubiquitina (ENSOCUG00000003613), molécula que interage, principalmente, com proteínas ribossomais (ENSOCUG000000025205, ENSOCUG00000003336 e RPS26), descrita na figura 14. A outra é a testaspanina (CD9) que relaciona-se com as integrinas α e β 5 (INGA5 e INGB5), a IZUMO1, dentre outras (Figura 14).

Uma das PLH de grande abundância no plasma seminal de cavalos é a clusterina (CLU), esta proteína possui redes de interações com a fator de crescimento epidermal (EGF), lactalbumina (LALBA), a mucina 16 (MUC16), fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF1) e também a fator de crescimento transformador beta-1 (TGFB1), conforme Figura 14. A fibronectin 1 (FN1) relaciona-se com a proteína tirosina kinase 2 (PTK2), proteína tirosina fosfatase, tipo não receptor 11 (PTPN11), com a CD44 e com as proteínas integrinas (ITG, ITGA4, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB7), conforme figura 14.

Em suínos, as glicoproteínas mais abundantes do plasma seminal PSP-I e PSP-II, interagem entre si e também com as mesmas proteínas, a CD22 e ao inibidor de acrosina associado ao espermatozoide (LOC396905), um inibidor de acrosina (Figura 14).

Figura 14 – Análise *in silico* das proteínas de ligação à heparina mais abundante do plasma seminal de coelhos, equinos e suínos. Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação: (—) banco de dados, (—) determinado experimentalmente, (—) genes próximos, (—) fusão entre genes, (—) co-ocorrência de genes, (—) *textmining*; (—) co-expressão e (—) homologia protéica. Ubiquitina (ENSOCUG00000003613), tetraspanina (CD9), clusterina (CLU), fibronectina 1 (FN1), glicoproteína mais abundante do plasma seminal PSP-I e PSP-II.



5 DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizaram-se as técnicas de cromatografia líquida de eficiência rápida (FPLC) e espectrometria de massas para identificar o perfil das proteínas ligadoras às moléculas de gelatina e heparina no plasma seminal de três espécies ruminantes e três não ruminantes. Adicionalmente, utilizaram-se ferramentas de bioinformática para identificação da ontologia gênica das PLG e PLH e verificaram-se as interações *in silico* entre as proteínas mais abundantes identificadas para cada espécie. A caracterização dessas proteínas seminais é de suma importância para elucidar os aspectos da biologia reprodutiva dos animais domésticos e, para futuras investigações de biomoléculas isoladas, indicando a melhor forma de purificação dessas proteínas.

As proteínas do plasma seminal de ligação à gelatina e heparina já vêm sendo investigadas em estudos realizados com as espécies: bovina (MANJUNATH *et al.*, 1987; PATEL *et al.*, 2016), bubalina (ARANGASAMY *et al.*, 2005; BOISVERT *et al.*, 2004), caprina (MOR *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2006; VILLEMURE *et al.*, 2003), equina (CALVETE *et al.*, 1997), humana (KOSANOVIC; JANKOVIC, 2010; KUMAR, *et al.*, 2009), ovina (BERGERON *et al.*, 2005) e suína (DAPINO *et al.*, 2009; MANASKOVA *et al.*, 2002).

De acordo com os resultados da ontologia gênica, os principais processos biológicos os quais as PLG e PLH encontram-se envolvidos em todas as espécies são os processos celulares e processos de regulação. As principais funções moleculares dessas proteínas são de ligação e atividade catalítica. Esses dados estão de acordo com os achados nas proteínas totais do plasma seminal de bovinos (REGO *et al.*, 2014), caprinos (VAN TILBURG *et al.*, 2015) e ovinos (SOUZA *et al.*, 2012). Em equinos, SWEGEN *et al.* (2015) identificaram que as proteínas do plasma seminal da espécie atuam, em sua maioria, no processo biológico celular e possui a maioria das proteínas com função de ligação, esses dados também estão de acordo com o nosso estudo nesta espécie.

Através da técnica de espectrometria de massas, identificaram-se quantidades diferentes PLG em cada espécie no plasma seminal de bovinos (354), caprinos (103), ovinos (51), coelhos (146), equinos (25) e suínos (87). As proteínas de ligação à gelatina (PLG) são moléculas caracterizadas por possuírem dois domínios de ligação à fibronectina (FN) e por suas habilidades múltiplas de ligação molecular, interagindo facilmente com diversos compostos, tal qual a

gelatina, glicosaminoglicanos, colina, fosfolipídios e lipoproteínas, desempenhando importantes funções na reprodução, como melhoria da funcionalidade do espermatozoide e atuação em passos para a capacitação espermática (ARANGASAMY *et al.*, 2005; KUMAR, S. *et al.*, 2016; MANJUNATH *et al.*, 2009; NAKANO *et al.*, 1996).

A molécula identificada como PLG de maior abundância na espécie bovina foi a espermedesina 1 (SPDA1), um total de 18,11 % das PLG totais. A SPDA1 é membro da família das proteínas lectinas, uma classe molecular que possui capacidade de ligação a açúcares de forma específica e reversível, aglutinam hemácias e precipitam glicoconjugados (LAM; NG, 2011; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Uma característica importante na estrutura dessas macromoléculas é a presença de um domínio CUB (DIAS *et al.*, 1997). As espermedesinas são biomoléculas multifuncionais, com habilidades de ligações a uma ampla gama de moléculas, incluindo proteínas, glicosaminoglicanos sulfurados, carboidratos, fosfolipídios e inibidores de proteases, desta forma é uma macromolécula essencial em diversos passos até o processo de fertilização (TOPFER-PETERSEN *et al.*, 1998). A SPDA1, também denominada proteína ácida do fluido seminal (PAFS), apresenta expressão na vesícula seminal, ampola e tecidos epididimários de bovinos (WEMPE *et al.*, 1992). Esta proteína atua protegendo a célula espermática dos efeitos da peroxidação lipídica (EINSPANIER *et al.*, 1994). Outras funções importantes é o fato da SPDA1 estimular a divisão celular, a secreção de progesterona pelas células da granulosa *in vitro* em bovinos, desta forma atua como um potente fator de crescimento nas células da granulosa do ovário (EINSPANIER *et al.*, 1991).

Adicionalmente, identificaram-se dentre as PLG mais abundantes no plasma seminal dos animais de produção investigados e observaram-se outras proteínas da família das espermedesinas, a espermedesina Z13, em bovinos, a bodesina 2, em caprinos, e as proteínas de ligação a carboidrato AQN-3 e glicoproteína mais abundante do plasma seminal PSP-I, em suínos. Desta forma, sugere-se que a coluna de gelatina-agarose é eficiente na captação de proteínas lectinas.

No plasma seminal de caprinos, a PLG identificada com maior concentração (19,44%) foi bodesina 2 (bdh-2). TEIXEIRA *et al.* (2006) isolou essa lectina do plasma seminal de caprinos utilizando as cromatografias de troca iônica e de afinidade à heparina. VILLEMURE *et al.* (2003) identificou as proteínas de ligação à gelatina na espécie caprina, denominando-as de

GSP-14, 15, 20 e 22 kDa. MELO *et al.* (2008) observou alta expressão da bdh-2 na vesícula seminal de caprinos e clonou, pela primeira vez, o cDNA dessa espermidase.

A PLG encontrada em alta abundância (33,75 %) no plasma seminal de ovinos foi a peptidil prolil cis-trans isomerase B (PPIB), uma enzima membro da família das peptidil prolil cis-trans isomerases (PPIase). Em um recente estudo, identificaram-se receptores da PPIB nos compartimentos celulares das espécies *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* e *Sz. Pombe* (PEMBERTON; KAY, 2005). A PPIB também foi identificada nos tecidos relacionados à reprodução em ratos como na próstata, testículos, ovários e útero (KOUADJO *et al.*, 2007). A PPIB é uma enzima que catalisa a isomerização cis e trans entre as ligações peptídicas e forma uma hélice tripla semelhante ao colágeno, desta forma atua como molécula chaperona (ISHIKAWA *et al.*, 2017; WIEMELS *et al.*, 2017). A PPIB também foi relacionada com a alta fragmentação do DNA nas células espermática de humanos. O estudo ainda sugere que a alta concentração dessa e outras proteínas representam uma resposta imune para indivíduos com maiores quantidades de DNA espermático fragmentado (INTASQUI *et al.*, 2013).

No plasma seminal de coelhos, a anexina (ANEXA5) foi a PLG identificada em maior abundância (31,24 %). A ANEXA5 é uma molécula caracterizada estruturalmente por possuir um domínio alfa-helicoidal bem empacotado (GERKE; MOSS, 2002). ANEXA5 é uma proteína dependente de cálcio e que se liga a fosfolipídios, suas principais funções são a regulação da organização da membrana celular, proteção da integridade do DNA contra o estresse oxidativo e melhora a motilidade do espermatozoide humanos *in vitro* (LU *et al.*, 2011; TAO *et al.*, 2010). A ANEXA5 foi identificada como a proteína mais abundante do plasma seminal de coelhos, no mesmo trabalho observou que a alta concentração dessa proteína foi correlacionada positivamente com os parâmetros seminais de vigor, concentração e morfologia espermática, e negativamente com o percentual de espermatozoides com cabeças anormais (ARRUDA-ALENCAR *et al.*, 2012).

Já no plasma seminal de equinos a proteína secretória rica em cisteína 3 (CRISP3) foram caracterizadas como a PLG de maior concentração para a espécie (16,13 %). A CRISP3 pertence a um grupo de glicoproteínas secretoras ricas em cisteínas, as CRISPs, que inclui quatro membros. Por possuírem dois domínios, denominados CAP, os quais participam da adesão entre células, as CRISPs ligam-se à célula espermática e interagem com o oócito, participando da fusão entre gametas (COHEN *et al.*, 2008; KOPPERS *et al.*, 2011). A CRISP3 está entre as proteínas

mais abundantes do plasma seminal de equinos, esta molécula modula a interação entre os espermatozoides e os neutrófilos polimorfonucleares de equinos, desta forma regula a eliminação de espermatozoides que podem causar respostas inflamatórias no útero de éguas (DOTY *et al.*, 2011). A CRISP3 já foi purificada no plasma seminal humano através da cromatografia de afinidade à PSP94 imobilizada, a proteína apresentou especificidade às moléculas da coluna e, portanto, alta capacidade ligante (ANKLESARIA *et al.*, 2016).

Em suínos, a PLG mais abundante foi identificada como a espermedesina AQN-3 (21,88 %). A espermedesina AQN-3 reveste a membrana plasmática na região acrossomal dos espermatozoides de javalis, possui afinidade à glicoconjugados e glicoproteínas da zona pelúcida, desta forma desempenha importante função na interação e adesão entre os gametas masculino e feminino, sendo uma molécula essencial no processo de fusão entre os gametas (CALVETE; CARRERA; *et al.*, 1996; CALVETE *et al.*, 1993). Em um estudo recente, demonstrou-se a relação entre proteínas seminais de suínos e o número de animais nascidos, os autores observaram uma associação entre algumas proteínas seminais e esse parâmetro e identificaram que a AQN-3 é um candidato a biomarcador molecular para o baixo número de animais nascidos (KWON *et al.*, 2015).

O total de PLH identificadas nas espécies foi em bovinos (894), caprinos (789), ovinos (647), coelhos (600), equinos (556) e suínos (86). Portanto, as PLH foram identificadas em quantidades superiores quando comparadas as PLG o que demonstra uma maior afinidade das proteínas seminais por glicosaminoglicanos (GAGs). A heparina é um GAG secretado pelas células epiteliais do trato genital feminino durante a fase folicular, as PLH espermáticas ligam-se a esse carboidrato, ocasionando uma leve desestabilização da membrana plasmática, promovendo influxo de moléculas de Ca^{2+} , removendo colesterol e fosfolipídios da membrana, alterando a relação existente entre essas moléculas, acarretando no processo de capacitação espermática. Evento fundamental que ocorre no gameta masculino apenas no interior do trato genital feminino, conferindo à célula capacidade fecundante (LENZ *et al.*, 1983; VARNER *et al.*, 1993; YADAV *et al.*, 2013). Desta forma, as PLH têm papel crucial no processo de capacitação espermática e, portanto, uma classe de proteínas importantes para investigação.

No presente trabalho, observou-se que a PLH de maior concentração (23,35 %) no plasma seminal da espécie bovina foi a C-C motif quimiocina 2 (CCL2). A CCL2 constitui o grupo de proteínas quimiocinas, caracterizadas estruturalmente por possuir citocinas conservadas.

Esta proteína e seus receptores já foram identificados no plasma seminal humano, sendo uma molécula mediadora de processos inflamatórios. Estudo demonstrou que o fluido seminal regula as quimiocinas, incluindo a CCL2 desempenhando um papel essencial nos processos inflamatórios relacionados à formação de tumores (ADEFUYE *et al.*, 2016). Elevados níveis de quimiocinas no plasma seminal humano foram associados à prostatite crônica e hiperplasia prostática benigna (PENNA *et al.*, 2007). No epitélio cervical, as quimiocinas regulam as citocinas controlando a resposta imune na defesa contra agentes infecciosos (SHARKEY *et al.*, 2007). Em estudo realizado por WITT; LANDER (1994), os autores verificaram que as quimiocinas ligam-se ao GAG heparina, desta forma esse achado colabora com nosso estudo.

Em caprinos, a bodesina 2 foi a PLH identificada em maior abundância no plasma seminal da espécie, 31,42% seguida da clusterina (CLU), 5,51%. Nossos resultados mostraram que ambas foram identificadas como PLH e PLG na espécie. Adicionalmente, identificou-se que a CLU é uma proteína de ligação à gelatina e heparina também no plasma seminal da espécie equina. Colaborando com nossos achados PANKHURST *et al.* (1998) purificaram a clusterina humana por cromatografia de afinidade à heparina e MARTINS *et al.* (2013) também identificaram que esta proteína é uma PLH presente no plasma seminal de ovinos. A CLU é uma glicoproteína identificada em diversos tecidos em mamíferos, suas principais funções incluem proteção celular contra danos na membrana plasmática, atual do processo de espermatogênese, maturação espermática, adesão e agregação celular (BAILEY; GRISWOLD, 1999; BLASCHUK *et al.*, 1983; O'BRYAN *et al.*, 1994). Em estudo recente FUKUDA *et al.* (2016) identificaram que homens normozoospermicos possuem alta concentração de CLU comparado a indivíduos oligozoospermicos e azoospermicos não obstrutivos, dessa forma a clusterin é um importante biomarcador de fertilidade.

Na espécie ovina, a proteína identificada em maior concentração que se liga à heparina no plasma seminal da espécie foi a sorbitol desidrogenase (SORD), 11,91% das PLH totais. Corroborando com o nosso estudo MARTINS *et al.* (2013) já identificou que a SORD é uma PLH do plasma seminal de ovinos. A SORD é uma enzima que pode converter a glicose para frutose por meio da via glicolítica (KING; MANN, 1958). A SORD desempenha funções na maturação espermática e na fosforilação da tirosina, processo essencial para o batimento flagelar. A SORD também foi identificada nas células germinativas de ratos e seus níveis de mRNA foram identificados em espermátocitos e espermátides, desta forma sugeriu-se que esta enzima

esteja envolvida na espermatogênese (CAO *et al.*, 2009; KOBAYASHI *et al.*, 2002). Outra das PLH identificada em alta abundância foi a proteína S100 (S100A11), uma molécula exclusiva de vertebrados, pertencente ao grupo de proteínas da família S100, o qual inclui 24 membros. Sua principal característica estrutural é o fato de possuir sítios de ligação ao Ca^{2+} . As proteínas S100 possuem uma variedade de funções que incluem regulação da proliferação e diferenciação celular, apoptose, homeostase de íons de Ca^{2+} , estabilização na barreira sangue testículos, dentre outras (AMSELGRUBER *et al.*, 1994; DONATO, 2001; DONATO *et al.*, 2013). A S100A11 já foi mapeada no genoma de ovinos (INTERNATIONAL SHEEP GENOMICS *et al.*, 2010). Esta proteína também foi identificada nos testículos de bovinos, ovinos, suínos e gatos (AMSELGRUBER *et al.*, 1994), especificamente no citoplasma e nas células de Sertoli. Em coelhos, a proteína S100 foi identificada no epidídimo e também nas células de Sertoli (ABD-ELMAKSOUUD *et al.*, 2014). Em um estudo recente, demonstrou-se que as proteínas S100 têm afinidade por íons metálicos, sendo facilmente purificada em coluna cromatográfica contendo zinco (JACKSON *et al.*, 2017), assim, podem ser classificadas como proteínas de ligação ao zinco (ZBP).

No plasma seminal de coelhos, a ANNEXA5, além de ser a PLG de maior abundância identificada no plasma seminal da espécie, também é a PLH identificada em maior concentração (44,77 %), seguida da ubiquitina (Ub), que representa 1,61% das PLH totais identificadas. A Ub é uma molécula exclusiva de eucariotos e desempenha função, principalmente na regulação de proteínas. Degradando proteínas indesejáveis em um processo fisiológico ou modificando-as, tal processo é denominado ubiquitinação (PICKART; EDDINS, 2004). Essa biomolécula é secretada pelas células do epitélio epididimário e liga-se a superfície dos espermatozoides bovinos. Dessa forma, muitos espermatozoides defeituosos são ubiquitinados e fagocitados pelas células do epidídimo (SUTOVSKY *et al.*, 2001). Durante o processo de espermatogênese, a ubiquitinação atua nas espermatogônias diferenciando-as dos gonócitos, durante a meiose atua no silenciamento dos cromossomos sexuais e na espermiogênese, remove os nucleossomos, estabilizando estruturas nas espermátides maduras (BOSE *et al.*, 2014; VIGODNER, 2011). A Ub também atua na modulação das concentrações de receptores esteroides, desenvolvimento placentar e modificações endometriais até o início da gestação (BEBINGTON *et al.*, 2001).

Em equinos, a proteína de ligação à carboidratos AWN é a PLH mais abundante (50,05%). E, em suínos, esta é a segunda proteína de ligação à heparina de maior concentração no plasma seminal da espécie, representando 10,90% das PLH totais. Corroborando com nossa pesquisa CALVETE; DOSTALOVA; *et al.* (1996) identificaram que a AWN é uma PLH e KRAUS *et al.* (2001) também separaram por cromatografia de afinidade à heparina no plasma seminal humano uma proteína homóloga à AWN suína. Pertencente à classe de proteínas lectinas, a AWN é uma espermedesina secretada pelas glândulas sexuais acessórias e liga-se à superfície espermática no momento da ejaculação. A espermedesina equina AWN possui 98% de homologia com a AWN suína (REINERT *et al.*, 1996). Cinco proteínas da família das espermedesinas já foram identificadas no fluido seminal em suínos, estas são as AQN-1, AQN-2, AWN, PSP-I e PSP-II, representando aproximadamente 75% das proteínas totais identificadas no plasma seminal da espécie. Através do mecanismo de reconhecimento de carboidratos, a AWN atua como mediadora da adesão da célula espermática à zona pelúcida do oócito, participando de eventos iniciais da fertilização e prevenindo a reação acrossômica prematura (TOPFER-PETERSEN *et al.*, 1998). Em um estudo recente, demonstrou-se que a AWN suína interage com fosfolipídios através do ácido fosfatídico e cardiolipina que são moléculas mediadoras dessa ligação, desta forma o ácido fosfatídico desempenha um papel na desestabilização da membrana induzida por cátions e eventos de fusão, protegendo a membrana espermática (SCHROTER *et al.*, 2017).

6 CONCLUSÃO

O plasma seminal de bovinos, caprinos, ovinos, coelhos, equinos e suínos apresentou uma grande variedade de proteínas de ligação à gelatina e heparina. Através das análises *in silico*, identificou-se que esses grupos de proteínas participam, principalmente, dos processos biológicos celulares e de regulação e possuem funções moleculares de ligação e atividade catalítica. Em linhas gerais, as PLG e PLH mais abundantes do plasma seminal possuem uma ampla rede de interação proteína-proteína. A espécie bovina apresentou no plasma seminal uma maior variação de diferentes PLG e PLH enquanto a espécie suína apresentou uma menor quantidade dessas biomoléculas. Dessa forma, as PLG e PLH são proteínas importantíssimas na reprodução animal,

podendo ser potenciais candidatas à biomarcadores dos processos biológicos ligados à fertilidade em animais de produção.

CAPÍTULO II - METABOLÔMICA DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM A FERTILIDADE

RESUMO

A baixa fertilidade em touros é um problema que afeta a eficiência reprodutiva nos rebanhos e, conseqüentemente, causa um forte impacto na economia para a produção de carne e leite. Desta forma, ferramentas biotecnológicas, como a metabolômica, representa um avanço potencial para o auxílio na escolha de reprodutores com caracteres seminais essenciais para o sucesso na fertilização e, como consequência, acréscimo no número de animais nascidos, elevando os níveis de produção nos rebanhos. Além do mais, ciências “ômicas” são de grande importância para elucidar eventos biológicos em diversas espécies. O objetivo deste estudo foi identificar metabólitos espermáticos e associá-los à fertilidade em touros Holstein. Para atingir esse objetivo, identificaram-se utilizando a técnica de GC-MS os metabólitos de espermatozoides de 10 touros com alta (n = 5) e baixa (n = 5) fertilidade. Adicionalmente, foram realizadas análises estatísticas multivariada e univariada através do programa MetaboAnalyst 3.0, para identificar os metabólitos associados a fertilidade e as principais vias metabólicas envolvendo as células espermáticas de bovinos. Os resultados mostraram que dentre os 41 diferentes metabólitos identificados nos espermatozoides, os níveis de quatro compostos foram diferentemente significativos e, portanto, podem ser utilizados como biomarcadores moleculares. Esses metabólitos foram aminometano e ácido azeláico (maiores em espermatozoides dos touros de baixa fertilidade) e ácido butírico e uréia (maiores nos espermatozoides dos touros de alta fertilidade). Através da análise *in silico*, identificou-se que as rotas metabólicas com maior impacto nas células espermáticas atuam no metabolismo do metano (p = 0,40) e na biossíntese de valina, leucina e isoleucina (p = 0,33). Os resultados são significativos porque ajudam a promover a ciência animal básica e os biomarcadores identificados podem ser usados na biotecnologia reprodutiva para avaliar a qualidade do sêmen e prever a fertilidade de reprodutores.

Palavras-chave: Ácidos graxos. GC-MS. Metabolismo. Oleamida. Reação acrosômica.

METABOLOMICS PROFILE FROM BULLS SPERMATOZOA AND ITS ASSOCIATION WITH FERTILITY

ABSTRACT

Low fertility in bulls is a problem that affects the reproductive efficiency in herds, consequently, causing a strong impact on the economy for meat and milk production. In this way, biotechnological tools such as metabolomics represent a potential advance in the selection of breeders with sperm characteristics essential for success in fertilization. Increasing the number of animals born and the levels of production in the herds. Moreover, "omics" sciences are of great importance for the biological events in several species. The objective of this study was to identify sperm metabolites associated with fertility in Holstein bulls. To achieve this goal we used GC-MS technique to identify sperm metabolites from 10 bulls with high (n = 5) and low (n = 5) fertility. In addition, multivariate and univariate statistical analyzes were performed through the MetaboAnalyst 3.0 program to identify the metabolites associated with fertility and as the main metabolic pathways involving in bull sperm cells. The results showed that of the 41 different metabolites detected in spermatozoa, the levels of four metabolites were significantly different and therefore could be used as biomolecular markers. These metabolites were aminomethane and azelaic acid (higher in spermatozoa of low fertility bulls) and butyric acid and urea (higher in spermatozoa of high fertility bulls). *In silico* analysis showed that the pathways with more impact on sperm cells acts on methane metabolism (p = 0.40) and biosynthesis of valine, leucine and isoleucine (p = 0.33). The results are significant because they help promote basic animal science and the identified biomarkers can be used in reproductive biotechnology to predict semen quality and fertility in breeding bulls.

Key words: Acrosome reaction. GC-MS. Fatty acids. Metabolism. Oleamide.

8 INTRODUÇÃO

O estudo da fertilidade em touros é a chave fundamental para o sucesso na reprodução animal, impactando fortemente para os fatores econômicos da produção de carne e leite. Adicionalmente, o sucesso do número de animais nascidos em todos os tipos de rebanhos requer touros com características fisiológicas essenciais à fertilização. Já que muitos problemas relacionados ao baixo número de fêmeas prenhas têm uma alta correlação com a capacidade fecundante do gameta masculino (SAACKE *et al.*, 2000). Além do mais, as determinações da qualidade espermática e da fertilidade dos rebanhos ainda dependem de exames de gestação, da análise de espermatozoides assistida por computador (CASA) e de outras abordagens gerais que requerem tempo para a detecção precisa da fertilidade. Desta forma, potentes ferramentas como as ciências "ômicas" tornaram-se cada vez mais importantes para uma melhor compreensão de aspectos fisiológicos dos espermatozoides e para a seleção de animais com fenótipos de alta fertilidade. Assim, a metabolômica destaca-se por ter sido empregada para o estudo da fertilidade em animais e seres humanos, bem como em pesquisas com doenças (GILANY *et al.*, 2014; INSENER *et al.*, 2013; KOVAC *et al.*, 2013; KUMAR, A.; KROETSCH; *et al.*, 2015; KUMAR, R. D.; THULASIRAMAN; *et al.*, 2015).

Os metabólitos são biomoléculas de baixo peso molecular e representam os produtos finais dos processos celulares. Podem ser classificados de acordo com sua estrutura molecular em: álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos, cetonas voláteis, espécies iônicas, lipídios hidrofóbicos, dentre outros (KOVAC *et al.*, 2013; TSUGAWA *et al.*, 2011; ZHANG, A. *et al.*, 2012). Os métodos mais abrangentes para identificação do metaboloma são a eletroforese capilar (EC-EM), cromatografia líquida (CL-EM) e gasosa (CG-EM) acoplada à espectrometria de massas, espectroscopia de infravermelho de infraestrutura de Fourier (EIFF), espectroscopia de raio infravermelho próximo (EIP), espectroscopia Raman (ER) e a ressonância magnética nuclear (RMN) (GOODSON *et al.*, 2012; KOVAC *et al.*, 2013; MUNOZ *et al.*, 2014; SELI *et al.*, 2010; SINGH; SINCLAIR, 2007; TSURUOKA *et al.*, 2013).

Em um estudo recente, pesquisadores avaliaram duas técnicas a NMR e a GC-MS para identificar metabólitos dos espermatozoides humanos. Os autores identificaram 42 metabólitos por NMR e 27 por GC-MS, demonstrando uma detecção de diferentes compostos na técnica de NMR. No entanto, a GC-MS já foi utilizada para a identificação de metabólitos em compostos

vegetais (CEVALLOS-CEVALLOS *et al.*, 2011), alimentos (TRIVEDI *et al.*, 2016), drogas (DAGHIR; MARKUSZEWSKI, 2010) ou tecidos e fluidos (NAZ *et al.*, 2014). Desta forma, GC-MS é eficaz para investigar metabólitos.

Outras pesquisas interessantes sobre metabolômica investigaram as funções dos metabólitos animais na fisiologia espermática. Em estudo realizado com espermatozoides de ratos, observou-se que a ação de substratos glicolíticos tem associação com fosforilação de tirosina e produção de energia pela célula espermática, sendo essencial na manutenção da motilidade flagelar (GOODSON *et al.*, 2012). Em suínos, um estudo comparou as vias de glicólise e gliconeogênese para a produção de lactato/piruvato e analisou que a via de gliconeogênese é quase inutilizada para a produção de energia para os espermatozoides na espécie (MARIN *et al.*, 2003). Já em caprinos, a adição de glicose nas células espermáticas durante o armazenamento líquido, melhorou a sustentação da motilidade quando comparado à suplementação com o lactato e piruvato (QIU *et al.*, 2016).

Portanto, a caracterização dos metabólitos espermáticos podem fornecer informações essenciais para a identificação de compostos determinantes da fertilidade e assim, contribuir para o conhecimento reprodutivo de touros e servir como base na busca de biomarcadores de eficiência reprodutiva. Desta forma, a presente pesquisa tem como objetivo a identificação dos metabólitos espermáticos em bovinos e investigar suas associações com a fertilidade animal.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Desenho experimental

Para o presente estudo, utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para determinar o perfil de metabolômico dos espermatozoides de touros adultos Holstein. Utilizaram-se ferramentas de bioinformática e estatísticas para avaliar as quantidades de metabólitos significativamente diferentes nos espermatozoides de animais com dois fenótipos de fertilidade, baixa (N = 5) e alta (n = 5) fertilidade determinados *in vivo*.

9.2 Determinação da fertilidade do touro

A fertilidade dos touros foi calculada de acordo com o desvio das taxas médias de concepção do grande número de animais da Alta Genetics, Inc. usando o software Probit F90 (CHANG *et al.*, 2014). A partir de classificação pelas taxas de fertilidade dos touros, os animais foram agrupados: cinco de alta fertilidade (AF) e cinco de baixa fertilidade (BF). Todos os fatores que influenciaram no desempenho da fertilidade foram ajustados usando o modelo descrito por (ZWALD *et al.*, 2004a;2004b).

9.3 Extração de metabólitos espermáticos de touros

O sêmen dos animais foi coletado por vagina artificial. Após a coleta, todas as amostras de sêmen foram centrifugadas a $700 \times g$ a 4°C durante 15 minutos para separar o plasma seminal dos espermatozoides. Em seguida, as células espermáticas foram armazenadas em microtubos estéreis a -80°C para as próximas etapas. As amostras de cada animal, contendo espermatozoides congelados (20×10^6 /touro), foram ressuspensas em tubos de ultracentrífuga com 8 mL de metanol e 1 mL de água ultrapura (8:1), adicionou-se 150 μL de padrão interno, o ácido heptadecanoico (1 mg/mL de metanol). Posteriormente, todas as amostras foram congeladas lentamente em vapor de nitrogênio líquido e descongeladas à temperatura ambiente durante cinco vezes. As amostras foram então sonicadas em água utilizando um banho ultra-sônico (Fisher Scientific™ CPXH5 Series Ultrasonic Baths; Pittsburgh, PA, USA) operado a 120W, frequência de 40 kHz a 25°C durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram ultracentrifugadas (Optima™ L-90k, Type 70 Ti Rotor, BECKMAN COULTER) a $40\,000 \times g$ a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante no interior dos tubos foram filtrados com uma seringa de 12mL + agulha 18G e filtros de membrana de nylon (0,2 μm) para remover resquícios celulares. O volume total do filtrado foi transferido para tubos de ensaio e evaporado até secar completamente, para esta etapa, utilizou-se o gás nitrogênio ultra puro em um evaporador Turbovap® LV (Biotage, Charlotte, NC) a 40°C , posteriormente, lavaram-se as extremidades dos tubos com 2,2 mL de metanol. Uma alíquota de 1 mL dessa mistura contendo os metabólitos foi resuspensa em tubo vial ambar e evaporado novamente com nitrogênio no Turbovap® LV (Biotage, Charlotte, NC) a 40°C (PAIVA *et al.*, 2015).

Para o processo de derivatização, adicionou-se nos tubos 50 μL de cloridrato de metoxiamina (20 mg/mL em piridina), os tubos foram homogeneizados e aquecidos a 70°C durante 1 hora. Em seguida, 100 μL de N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorossilano (BSTFA + 1% TMCS; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foram adicionados aos tubos, misturados e aquecidos, mais uma vez, a 70 °C durante 1 h. Então, a solução foi transferida para um vial âmbar com inserção fixa para CG-EM.

9.4 Análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Todas as amostras foram microinjetadas automaticamente em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas. Os equipamentos utilizados incluíram um sistema Agilent 7890A, de GC acoplado a um XL MSD com um detector de massas contendo três eixos, um Agilent 7693 Series Autosampler e uma coluna capilar DB-5MS (30 m \times 0,25 mm i.d. \times 0,25 μm ; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A fase móvel utilizada foi o gás de hélio. O volume de injeção utilizado foi de 1 μL para cada amostra, em um fluxo de 1 mL/min a 280°C. A linha de transferência da espectrometria de massa foi uma fonte de íons com gradiente de temperatura mantida a 70°C durante 1 min, depois aumentada a 250 °C e, diminuída a 230 °C e 150°C. O tempo total de cada ciclo cromatográfico foi de 37 minutos. O forno do CG foi programado inicialmente a 70°C durante 4 minutos, a temperatura foi aumentada gradativamente em 8°C/min até atingir 300°C e, depois, manteve-se a 300°C por 5 min. Para a EM a fonte de ionização utilizada foi a de impacto de elétrons (EI) a 70 eV. Os espectros de massas foram obtidos com um intervalo de 35-800 m/z à 10.000 uma/s e 10.3 scans/s (intervalos de 0.2 m/z).

Os metabólitos foram identificados de acordo com seus tempos de retenção, probabilidade e espectros de massa identificados em comparação com o programa NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Version 2.0) e as estruturas químicas confirmadas através do PubChem Compounds (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>).

A identificação do metabólito foi baseada em um íon alvo e dois íons quantitativos. Todos os compostos identificados foram agrupados em suas classes químicas usando o Human Metabolome Database versão 3.6 (HMDB); (WISHART *et al.*, 2013; WISHART *et al.*, 2007). Para o cálculo da abundância, o valor dos íons alvos de cada metabólito foi dividido pelo padrão

interno (ácido heptadecanóico) e os valores de abundância obtidos foram utilizados para análises estatísticas.

9.5 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas usando MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>; XIA; WISHART, 2016). Cada composto foi normalizado pela soma em autoescala. Para as análises multivariadas, realizou-se a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) no intuito de identificar diferenças significativas nos perfis do metaboloma entre os fenótipos de fertilidade. A análise das Variáveis de Importância de Projeção (VIP), com base no modelo PLS-DA, foi calculada para identificar os biomarcadores potenciais nos touros de alta e baixa fertilidade. Desta forma, consideraram-se no *Heat-Map* os metabólitos com o $VIP > 1,5$ como potenciais biomarcadores para fertilidade. As análises univariadas foram conduzidas utilizando o teste t para comparar a significância estatística ($p < 0,05$) entre a fertilidade dos touros.

9.6 Análise *in silico* das rotas metabólicas

As principais rotas metabólicas, as quais os metabólitos dos espermatozóides bovinos participam, foram avaliadas através da análise de enriquecimento utilizando o exato de Fisher no programa MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>; XIA; WISHART, 2016).

10 RESULTADOS

10.1 Fertilidade dos touros

As taxas de não-retorno ao estro das fêmeas inseminadas em 45 dias por cada animal variaram entre 5,42 e -10,62%, conforme a tabela 8. Desta forma, os animais foram agrupados em dois fenótipos de fertilidade, alta e baixa fertilidade.

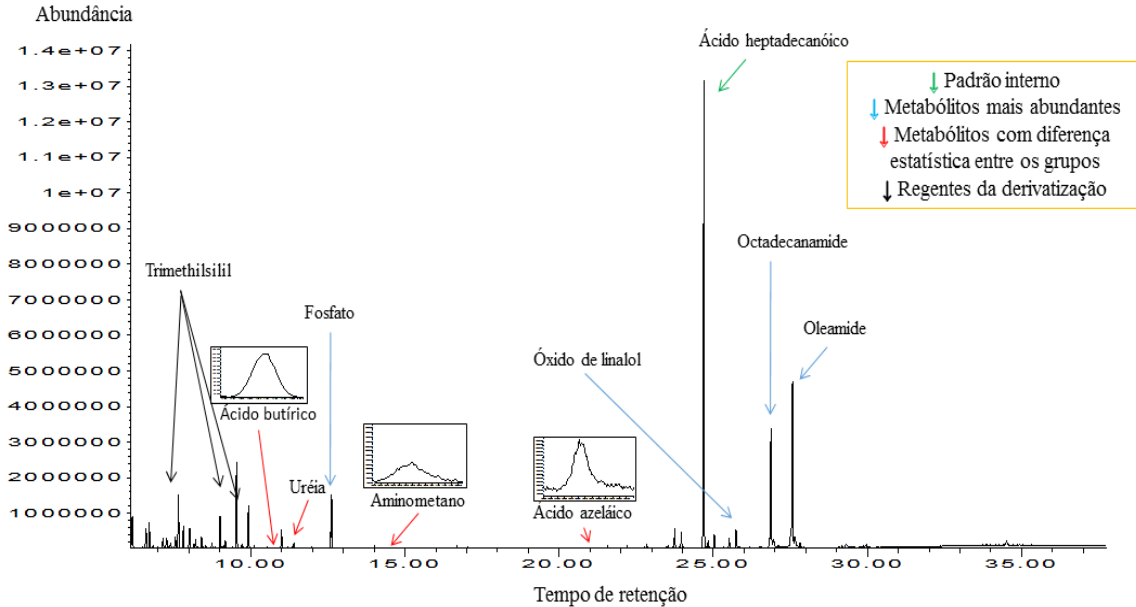
Tabela 8 – Fertilidade de touros Holstein classificados em alta (números de 1 a 5) e baixa (números de 6 a 10) fertilidade.

Fertilidade	Número do animal	Número de inseminações	Taxa de não retorno ao estro (%) em 45 dias
Alta fertilidade	1	5293	5,42
	2	825	5,10
	3	2032	4,80
	4	2487	3,59
	5	5751	3,56
Baixa fertilidade	6	1604	- 3,75
	7	2276	- 4,06
	8	967	- 4,49
	9	5603	- 6,76
	10	674	- 10,62

Fonte: dados da pesquisa.

10.2 Perfil metabólico dos espermatozoides bovinos

A análise por CG-ES permitiu a identificação de 41 metabólitos diferentes dos espermatozoides dos touros (Tabela 9). O cromatograma de referência das células espermáticas de bovinos gerado pelo CG-ES pode ser visualizados na Figura 15.

Figura 15 – Cromatograma de referência dos metabólitos espermáticos de touros.

Fonte: dados da pesquisa.

Os metabólitos dos espermatozoides foram definidos de acordo com sua classe química (Tabela 9). As classes químicas identificadas com mais metabólitos foi a dos ácidos graxos (17 compostos) e dos ácidos carboxílicos e derivados (8 compostos).

Tabela 9 – Metabólitos identificados nos espermatozoides de touros por CG-MS. Os metabólitos foram identificados por referências na biblioteca do NIST e foram classificados com base na sua classe química usando o Human Metabolome Database 3.6 (HMDB). Os metabólitos foram identificados de acordo com o tempo de retenção, um target íon e dois íons quantitativos.

Metabólito e classificação química	Tempo de retenção	Íon alvo	Íon quantitativo 1	Íon quantitativo 2
<i>Alcanos</i>				
3-t-Pentilciclopentanona	7,271	84,2	71,2	154,2
	9,002	85,2	69,2	43
Pentano	9,114	85,2	69,2	43

<i>Aminas</i>				
n-Butilamina	9,114	174,2	73	128
Aminometano	14,989	234,2	73	147
<i>Benzeno e derivados substitutos</i>				
Ácido benzóico	11,909	179,2	77	105
<i>Carboidratos e carboidratos conjugados</i>				
d-manitol	6,482	207	73	249,2
Glicerol	12,620	147,2	73	205,2
<i>Ácidos carboxílicos e derivados</i>				
Acetamida	6,429	188	73	248,2
	6,704	155,2	72	58,2
Dietilacetamida	7,144	87,2	72	43
Ácido oxálico	9,920	147,2	73	133,2
	10,108	191,2	73	147,2
Ácido acético	12,170	191	73	146,8
L-Prolina	10,757	141,8	72,8	57,8
L-Serina	13,190	147	73	103
L-Valina	19,297	186	73	131,8
Ácido glioxílico	25,028	203,2	73	147,2
<i>Ácidos graxos</i>				
Ácido cáprico	8,357	173	73	116,6
Ácido heptanóico	10,372	187	73	116,8
Ácido butírico	11,408	147	73	174,2
Ácido nonanóico	13,944	117	73	215
Ácido sebácico	15,083	373,4	73	284,8
Ácido subérico	19,182	147	73	128
Ácido azeláico	20,511	317,2	73	201
Ácido adipíco	21,561	99	75	131
Hexadecanenitrila	21,766	100	69,8	97
Ácido palmítico	23,358	313,4	73	117

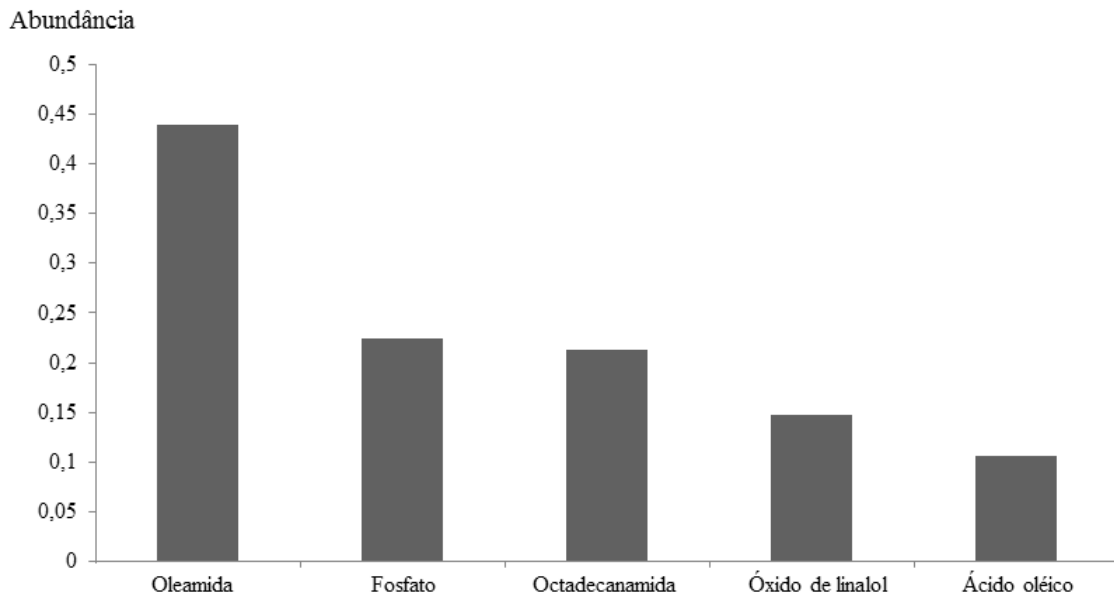
Oleanitrila	23,962	122,2	69,2	55
Octadecanamida	26,886	147,2	73	203,2
Oleamida trans	26,506	131,2	73	116
Ácido nonadecanóico	26,825	147	73	116
Oleamida	27,569	131,2	75	144,2
	27,509	131,2	73	144,2
	27,640	131,2	73	144,2
Ácido oléico	27,813	131,2	73	116
cis Ácido docosa-hexaenoico	28,994	91	73	207
<i>Compostos metalóides homogêneos</i>				
Borato	6,594	263,1	73	221,2
<i>Hidroxiácidos e derivados</i>				
Ácido láctico	8,205	147,2	73	147,2
<i>Cetoácidos e derivados</i>				
Ácido 2-cetobutírico	14,317	202,2	73	111,8
<i>Compostos oxo anionicos não- metálicos</i>				
Ácido fosforoso	8,704	318,2	73	225
Fosfato	12,584	299,4	73	314,4
<i>Ácido carbônico orgânico e derivados</i>				
Uréia	11,792	171,2	73	174,2
<i>Compostos orgânicos</i>				
Ácido ciclopentanocarboxílico	9,395	97,2	69	55
<i>Oxolanes</i>				
Óxido de linalol	25,739	131,2	73	116
<i>Esteróides e esteróides derivados</i>				
Colesterol	34,505	129,2	73	207,2

Fonte: dados da pesquisa.

Os metabólitos mais abundantes identificados nas células espermáticas de bovinos foram a oleamida, fosfato, octadecanamida, óxido de linalol e o ácido oléico (Figura 16).

Enquanto que os metabólitos de menor abundância foram a acetamida, ácido fosfórico, ácido subérico e a hexadecanitrila.

Figura 16 – Razões da abundância dos metabólitos de maiores concentrações presentes nos espermatozoides de touros.

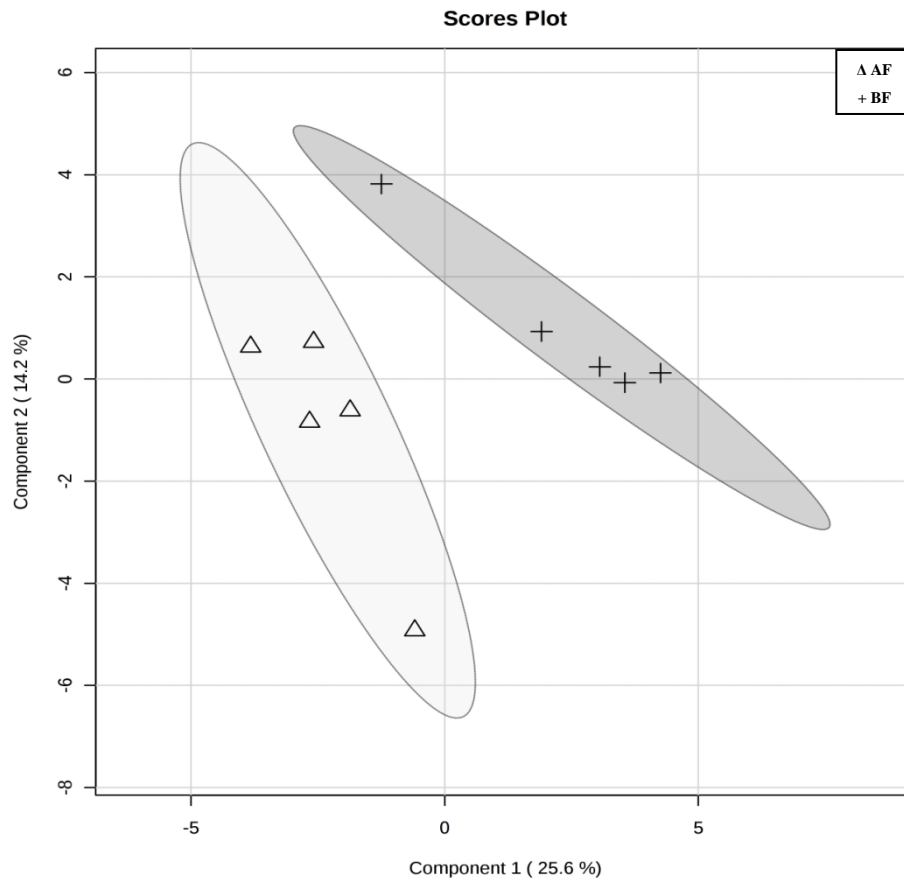


Fonte: dados da pesquisa.

10.3 Associações entre os metabólitos espermáticos e a fertilidade dos touros

O PLS-DA indicou uma clara separação entre os componentes 1 e 2 nos grupos dos touros de alta e baixa fertilidade (Figura 17). O PLS-DA dos metabólitos espermáticos dos touros mostrou que 25,6% das variações de dados correspondentes ao componente principal 1 e 14,2% das variações ao componente 2.

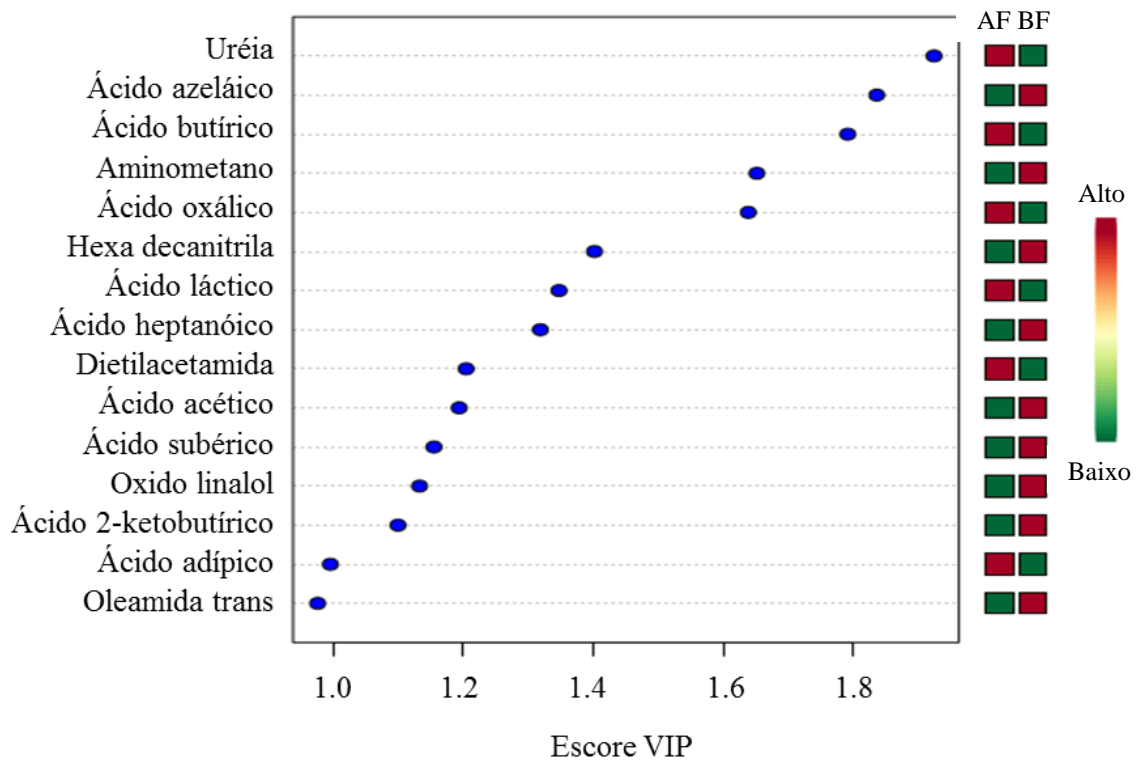
Figura 17 – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) dos metabólitos espermáticos de touros de touros alta (AF) e baixa fertilidade (BF). O PLS-DA mostra a simplificação de 41 metabólitos em 2 componentes principais, mostrando uma separação entre os componentes 1 e 2.



Fonte: dados da pesquisa.

O *Heat-Map* gerado pela análise do escore VIP mostrou que os metabólitos com VIP > 1,5 foram o aminometano, ácido azeláico, ácido butírico, ácido oxálico e uréia (Figure 18). A análise do mapa de calor, com base no escore VIP, indicou que a uréia, o ácido butírico e o ácido oxálico foram os metabólitos diferencialmente expressos em alta abundância nos touros de alta fertilidade, enquanto o ácido azeláico e o aminometano foram altos em touros de baixa fertilidade.

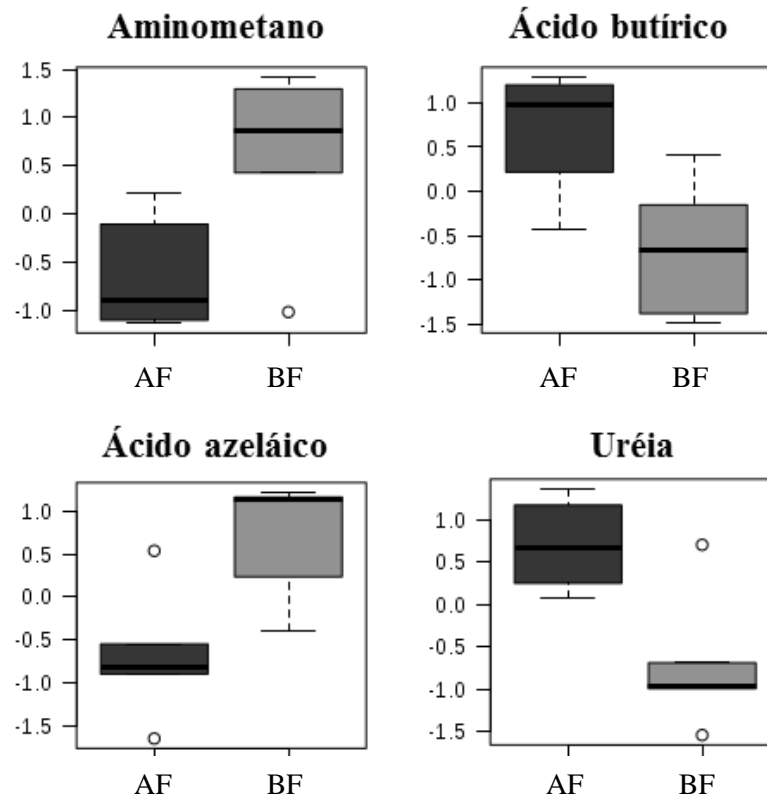
Figura 18 – Heat-Map do escore VIP dos metabólitos espermáticos em touros de alta (AF) e baixa fertilidade (BF). Os metabólitos selecionados foram aqueles com VIP 1 e 2. As caixas verdes ou vermelhas à direita indicam baixa ou alta concentração, respectivamente, do metabólito correspondente em touros AF e BF. A pontuação VIP foi baseada no modelo PLS-DA.



Fonte: dados da pesquisa.

A análise univariada (teste t) mostrou que 4 metabólitos (Figura 19) com diferença de significância ($p < 0,05$) entre os grupos (aminometano; $p = 0,04$, ácido azeláico; $p = 0,02$, ácido butírico; $p = 0,02$ e uréia; $p = 0,01$). O aminometano e ácido azeláico apresentaram-se em maiores concentrações nos espermatozoides de touros de baixa fertilidade e o ácido butírico e a uréia em maiores concentrações em touros de baixa fertilidade. Assim, os resultados da análise univariada concordaram com os das análises multivariadas.

Figura 19 – Gráficos de box plot das razões de abundância dos metabólitos espermáticos em touros alta (AF) e baixa fertilidade (BF) que foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) por análises univariadas (teste t).

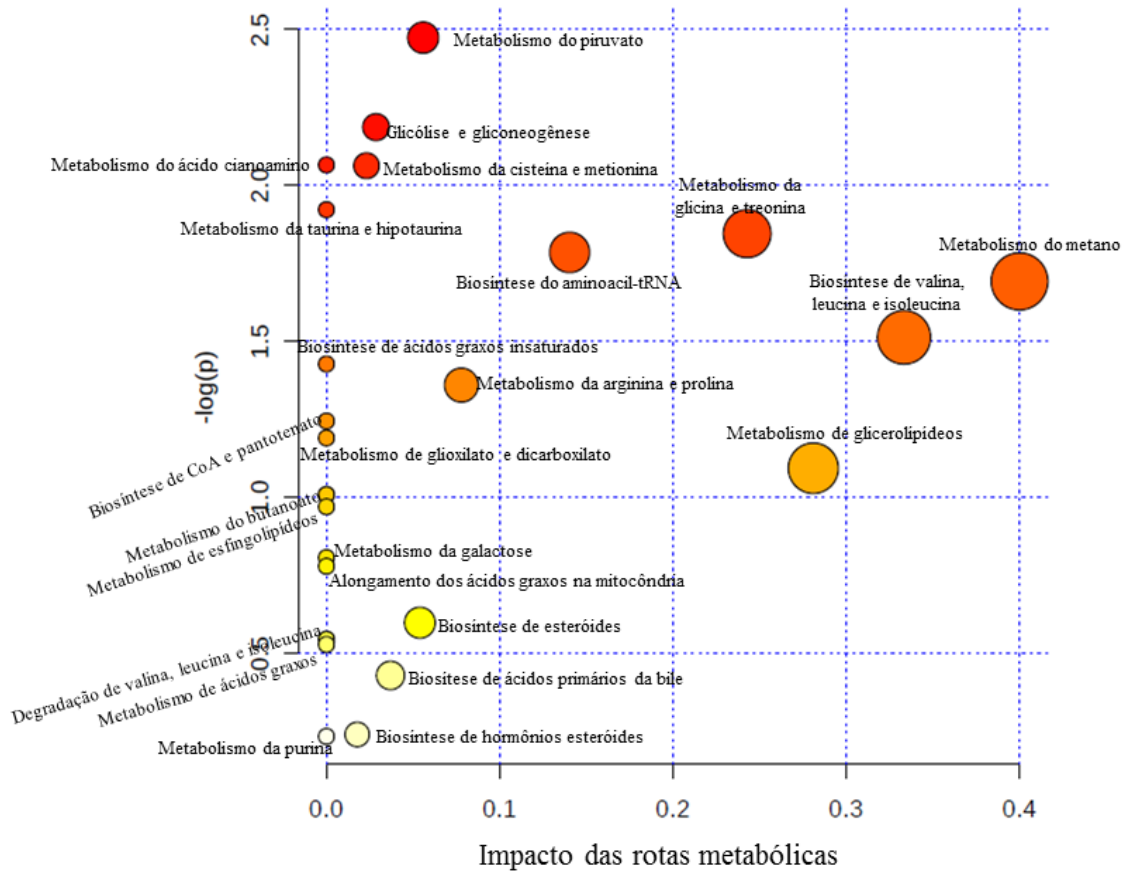


Fonte: dados da pesquisa.

10.4 Rotas metabólicas

As análises *in silico* das vias metabólicas associadas aos metabólitos espermáticos foram descritas na Figura 20. Nossos resultados mostraram, de acordo com o valor de p , que as vias mais impactantes na fisiologia espermática foram: a do metabolismo do metano (L-serina; $p = 0,40$), da biossíntese de valina, a leucina e isoleucina (L-valina; $p = 0,33$), metabolismo de glicerolípidos (glicerol; 0,28) e metabolismo de glicina, serina e treonina (ácido glioxílico e L-serina; $p = 0,24$).

Figura 20 – Resumo das principais rotas metabólicas as quais os metabólitos espermáticos de touros participam, gerado pelo MetaboAnalyst 3.0.



Fonte: dados da pesquisa.

11 DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizou-se a técnica de CG-EM para avaliar o perfil metabolômico das células espermáticas de bovinos e para identificar metabólitos candidatos a biomarcadores associados à fertilidade de touros. Ferramentas estatísticas e de bioinformática foram utilizadas para identificar biomoléculas associadas à fertilidade e às principais rotas metabólicas nas quais os compostos identificados estão envolvidos. Este é o primeiro estudo de perfil metabolômico relacionado com a fertilidade nas células espermática de animais domésticos.

Os metabólitos são biomoléculas de baixo peso molecular e correspondem aos produtos finais das reações metabólicas que ocorrem no interior das células. Os principais estudos sobre essas biomoléculas na reprodução animal têm contribuído para a caracterização do metaboloma seminal em bovinos, caprinos, suínos e humanos (KUMAR, A.; KROETSCH; *et al.*, 2015; KUMAR, R. D.; THULASIRAMAN; *et al.*, 2015; MARIN *et al.*, 2003; QIU *et al.*, 2016).

No presente estudo, a classe química dos lipídios foi a que exibiu o maior número de metabólitos, 17 no total, como também apresentou os compostos mais abundantes identificados nos espermatozoides dos touros. Corroborando com os achados desse estudo, PAIVA *et al.* (2015) identificaram 12 composto lipídicos nos espermatozoides humanos. O fato dos compostos lipídicos representarem a classe de metabólitos em maior abundância se explica pelas células espermáticas serem basicamente compostas por uma membrana externa, a qual contém uma bicamada lipídica, uma membrana interna ou membrana do acrossoma, um núcleo compactado e, pouco ou inexistente citoplasma, sendo que as membranas são as maiores estruturas e ricas em lipídios (RENGAN *et al.*, 2012).

Já o metabólito mais abundante detectado nos espermatozoides dos touros foi a oleamida, que é um ácido graxo insaturado, composto por ácido oléico e um grupamento amida. Altas concentrações de ácido oléico já foram detectadas em espermatozóides e no plasma seminal de touros (NEILL; MASTERS, 1972), sabe-se também que este composto lipídico está presente nas membranas e organelas celulares (ROHWEDDER *et al.*, 2014; SPECTOR; YOREK, 1985). HOSSAIN *et al.* (2007) demonstraram que o ácido oléico tem um efeito positivo sobre as funções das células espermáticas de suínos, melhorando a motilidade, a viabilidade, bem como a reação do acrossoma dessas células. Desta forma, os autores sugeriram que isso ocorreu porque este ácido graxo insaturado produz ATP aumentando as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e cAMP, que por sua vez, poderiam ser responsáveis pela indução da reação acrossômicas em espermatozóides.

A octadecanamida foi o segundo metabólito mais abundante identificado nas células espermáticas dos touros. Ela é a um ácido esteárico com grupamento amida, que é classificado como um ácido graxo saturado. Esse ácido graxo junto com o ácido linoléico, representam 90% dos ácidos graxos saturados totais presentes nos espermatozóides humanos. Indivíduos com normozoospermia possuem menores concentrações de ácidos graxos saturados do que os

astenozoospermicos e oligoastenozoospermicos e existe uma correlação positiva entre a concentração de ácido esteárico e a motilidade espermática, antes e após o processo de criopreservação (MARTINEZ-SOTO *et al.*, 2013).

Através das análises do escore VIP (análise multivariada) e o teste t (análise univariada) identificou-se que os metabólitos aminometano e o ácido azeláico apresentaram maiores concentrações nos espermatozoides dos touros de baixa fertilidade. O aminometano é um composto orgânico com função tamponante nas células, aumentando a permeabilidade da membrana externa de bactérias (IRVIN *et al.*, 1981). Este metabólito é amplamente utilizado em meios de diluição seminal para criopreservação espermática de touros, bodes, camelos, cães e carneiros (NIASARI-NASLAJI *et al.*, 2006; PURDY, 2006; SILVA *et al.*, 2013; THUN *et al.*, 2002; YU, 2014). Devido possuir função tamponante, estima-se que esse composto atue na estabilização de pH, PK_a e osmolaridade espermática durante o processo de criopreservação, armazenamento espermático e na regulação do pH dos espermatozoides durante a passagem pelo trato genital feminino (GOOD *et al.*, 1966; NIASARI-NASLAJI *et al.*, 2006; PURDY, 2006; SUAREZ; PACEY, 2006). Dessa forma, é possível que os espermatozóides de touros de baixa fertilidade produzam mais aminometano na tentativa de manter o pH espermático ideal até o momento da fertilização. Já o ácido azeláico é o produto final da peroxidação do ácido linoléico e possui uma série de propriedades, incluindo a inibição da tirosina, inibição de enzimas mitocondriais, agente antitumoral, eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS), inibição da glicólise anaeróbica e a inibição de tioredoxinas em células de melanoma (NAZZARO-PORRO, 1987; PASSI *et al.*, 1991; SCHALLREUTER; WOOD, 1987). GOODSON *et al.* (2012) incubaram espermatozoides de ratos com frutose e, após um período de incubação, observaram a presença de ácido azeláico, desta forma, o ácido azeláico é um metabólito envolvido no metabolismo da frutose. Deste modo, como os espermatozóides de touros utilizam a frutose como umas das suas principais fontes de energia, provavelmente a maior formação de ácido azeláico é uma forma alternativa para que os espermatozoides de baixa fertilidade possam obter mais energia, essencial para o batimento flagelar e a motilidade.

Já nos animais de alta fertilidade, o escore VIP e o teste t demonstraram que o ácido butírico e a uréia estavam em maiores níveis do que nos animais de baixa fertilidade. O ácido butírico é um metabólito pertencente à classe dos ácidos graxos e suas principais funções incluem diferenciação celular, indução da citotoxicidade, possui efeitos bimodais na proliferação e

sobrevivência da célula (KURITA-OCHIAI *et al.*, 2003; KURITA-OCHIAI *et al.*, 2006). Na forma de γ -amino ácido butírico (GABA), este neurotransmissor atua na reação acrossômica e motilidade espermática (SHI *et al.*, 1997), como foi observado em um estudo anterior, no qual os autores adicionaram esse neurotransmissor em espermatozoides de homens com varicocele e oligozoospermicos e/ou astenozoospermicos e o resultado foi a melhoria das taxas de reação acrossômica nas células espermáticas de todos os indivíduos (MAHRAN; KHOLEF, 2014). Desta forma, os elevados níveis do ácido butírico nos espermatozoides de animais de alta fertilidade poderiam elevar as taxas de reação acrossômica (PUENTE *et al.*, 2011), o que possibilitaria um maior sucesso das células desses animais no momento da fertilização. A uréia é um dos compostos candidatos a biomarcador identificado em touros de alta fertilidade. A uréia é um composto orgânico formado principalmente em células do fígado e é excretado pelo sistema urinário de animais (KREBS, 1942), também representa o componente mais abundante de sólidos urinários (ROSE *et al.*, 2015) e sua principal função é o catabolismo protéico (WATFORD, 1991; WITHERS, 1998). No ciclo da uréia, que ocorre nas mitocôndrias das células (MORI *et al.*, 1983), os compostos nitrogenados são metabolizados para formar o fumarato, que por sua vez entra no ciclo de Krebs contribuindo com a produção de energia (DIETZ; FLIPSE, 1969) e nas células de esperma contribui com batimento flagelar. Em um estudo recente observaram-se que os níveis elevados de uréia no plasma seminal de homens estão associados à causa de infertilidades desconhecida, assim, a uréia pode ser considerada candidata a biomarcador relacionada à infertilidade (QIAO *et al.*, 2017). Em contapartida, outro estudo mostrou que a adição de compostos de urina, como a uréia, aos espermatozoides humanos manteve a motilidade espermática (KIM; KIM, 1998). Desta forma, sugerimos que a uréia em níveis fisiológicos contribui para a obtenção de energia de forma a auxiliar na motilidade espermática dos animais de alta fertilidade.

Através da análise *in silico*, observou-se que as rotas mais impactantes no material biológico em estudo foram as do Metabolismo do Metano e Biosíntese de Valina, Leucina e Isoleucina. A L-serina foi o metabólito espermático identificado envolvido na rota metabólica do Metabolismo de Metano. A L-serina é um aminoácido formado na célula a partir da conversão da glicina, durante esse processo unidades de carbonos são formadas e serão utilizadas para o metabolismo do metano (DE KONING *et al.*, 2003; IZUMI *et al.*, 1993; NEWMAN; MADDOCKS, 2017). A serina e a glicina estão envolvidas na síntese de aminoácidos, ácidos

nucléicos, lipídios, reações de metilação e na formação NADPH para a defesa das células, afetando a capacidade antioxidante celular e também suporta a homeostase para células cancerígenas em crescimento (AMELIO *et al.*, 2014; YANG; VOUSDEN, 2016). Nos espermatozoides humanos, as vias da serina estão envolvidas na capacitação de espermatozoides através da fosforilação deste aminoácido (NAZ, R. K., 1999; NAZ, R. K.; RAJESH, 2004). A serina e a treonina regulam os níveis de fosforilação nas proteínas da cabeça e da cauda dos espermatozoides de hamsters, desempenhando um papel importante na hiperativação espermática, na capacitação e na reação do acrossômica (JHA; SHIVAJI, 2002). Desta forma, sugerimos que a rota metabólica identificada tem maior impacto porque a capacitação espermática é um evento essencial para a fertilização. Para que ocorra a capacitação espermática, é necessário uma série de eventos nas células, que incluem contato com substâncias do trato genital feminino, influxo de cálcio, remoção de colesterol e fosfolipídeos da membrana, cascata de ativação da proteína kinase A, dentre outros, os quais são modulados por proteínas e outras biomoléculas (GALANTINO-HOMER *et al.*, 2004; ICKOWICZ *et al.*, 2012). A outra rota metabólica com maior impacto é a da Biossíntese de Valina, Leucina e Isoleucina, na qual esses aminoácidos são os produtos finais. Para a formação desses aminoácidos o piruvato é convertido em 2-acetolactato até formar a L-valina, um aminoácido envolvido no estresse, energia e metabolismo muscular (ZHANG *et al.*, 2017). Em um estudo recente, verificou-se que a falta de valine no plasma seminal de humanos astenozoospermicos tem sido associada à baixa motilidade espermática (TANG *et al.*, 2017). Em outro estudo realizado com a espécie suína, observou-se que a adição de aminoácidos na dieta, como a valine, melhorou a motilidade, morfologia espermática, integridade do acrossoma dos espermatozoides e aumentou o número de animais nascidos (DONG *et al.*, 2016).

12 CONCLUSÃO

Através do presente estudo demonstramos que a oleamida, a octadecanamida, o ácido fosfórico e o ácido oléico são os metabólitos mais abundantes identificados nos espermatozoides de touros. Também observou-se que existe uma clara separação entre os perfis de metabólitos em touros de alta e baixa fertilidade e que o aminometano, ácido azeláico, ácido butírico e uréia são candidatos biomarcadores para a fertilidade de touros. Os presentes resultados somam a base de

conhecimento em fisiologia espermática e na biotecnologia reprodutiva para bovinos e podem ser aplicados à biologia reprodutiva de outros mamíferos.

13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do presente estudo demonstrou-se que as abordagens “ômicas” incluindo a proteômica e a metabolômica são ferramentas de grande valia para o estudo de biomoléculas seminais em animais de produção.

A identificação das proteínas do plasma seminal de ligação à gelatina e heparina e suas análises *in silico* nos mostrou que essas biomoléculas participam de diversos eventos fisiológicos que viabilizam o sucesso na fertilização. Além do mais, este estudo indica passos iniciais para purificação de uma proteína alvo para futuro estudo funcional.

Através do metaboloma dos espermatozoides bovinos identificou-se uma ampla gama de compostos, dentre os quais, o aminomethane, azelaic acid, butyric acid e urea podem ser potenciais candidatos a biomarcadores moleculares relacionados à fertilidade.

Adicionalmente, futuras investigações devem ser realizadas com essas proteínas e metabólitos de forma a identificar suas reais funções nas células espermáticas, meios de fertilização *in vitro* e nos processos de criopreservação para incrementar a melhoria nos procedimentos biotecnológicos na reprodução.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELMAKSOU, A.; SHOEIB, M. B.; MAREI, H. E. Localization of S-100 proteins in the testis and epididymis of poultry and rabbits. **Anat Cell Biol** [S.I.], v. 47, n. 3, p. 180-7, 2014.
- ADEFUYE, A. O. *et al.* Seminal Fluid-Mediated Inflammation in Physiology and Pathology of the Female Reproductive Tract. **J Immunol Res** [S.I.], v. 2016, p. 9707252, 2016.
- AMELIO, I. *et al.* Serine and glycine metabolism in cancer. **Trends Biochem Sci** [S.I.], v. 39, n. 4, p. 191-8, 2014.
- AMSELGRUBER, W. M.; SINOWATZ, F.; ERHARD, M. Differential distribution of immunoreactive S-100 protein in mammalian testis. **Histochemistry** [S.I.], v. 102, n. 3, p. 241-5, 1994.
- ANKLESARIA, J. H. *et al.* Purification and characterization of CRISP-3 from human seminal plasma and its real-time binding kinetics with PSP94. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** [S.I.], v. 1039, p. 59-65, 2016.
- ARAKI, N. *et al.* Seminal vesicle proteins SVS3 and SVS4 facilitate SVS2 effect on sperm capacitation. **Reproduction** [S.I.], v. 152, n. 4, p. 313-21, 2016.
- ARANGASAMY, A. *et al.* Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 90, n. 3-4, p. 243-54, 2005.
- ARCHIBALD, A. L. *et al.* The sheep genome reference sequence: a work in progress. **Anim Genet** [S.I.], v. 41, n. 5, p. 449-53, 2010.
- ARRUDA-ALENCAR, J. M. *et al.* Major proteins of the seminal plasma of New Zealand White rabbits and association with semen criteria. **World Rabbit Science Association** [S.I.], v. 10, n. 10, p. 395-399, 2012.
- BAILEY, R.; GRISWOLD, M. D. Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. **Mol Cell Endocrinol** [S.I.], v. 151, n. 1-2, p. 17-23, 1999.
- BEBINGTON, C.; DOHERTY, F. J.; FLEMING, S. D. The possible biological and reproductive functions of ubiquitin. **Hum Reprod Update** [S.I.], v. 7, n. 1, p. 102-11, 2001.
- BERGERON, A. *et al.* Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Mol Reprod Dev** [S.I.], v. 71, n. 4, p. 461-70, 2005.
- BHATIA, V. N. *et al.* Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. **Anal Chem** [S.I.], v. 81, n. 23, p. 9819-23, 2009.

- BLASCHUK, O.; BURDZY, K.; FRITZ, I. B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. **J Biol Chem** [S.I.], v. 258, n. 12, p. 7714-20, 1983.
- BOISVERT, M. *et al.* Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biol Reprod** [S.I.], v. 70, n. 3, p. 656-61, 2004.
- BOSE, R. *et al.* Ubiquitin-proteasome system in spermatogenesis. **Adv Exp Med Biol** [S.I.], v. 759, p. 181-213, 2014.
- CABALLERO, I. *et al.* Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology** [S.I.], v. 70, n. 8, p. 1352-5, 2008.
- CABALLERO, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. **Vet Med Int** [S.I.], v. 2011, p. 757194, 2010.
- CALVETE, J. J. *et al.* Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. **Eur J Biochem** [S.I.], v. 218, n. 2, p. 719-25, 1993.
- CALVETE, J. J. *et al.* Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Lett** [S.I.], v. 407, n. 2, p. 201-6, 1997.
- CALVETE, J. J. *et al.* Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins. **FEBS Lett** [S.I.], v. 379, n. 3, p. 207-11, 1996.
- CALVETE, J. J.; CARRERA, E.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. **Biol Chem** [S.I.], v. 377, n. 7-8, p. 521-7, 1996.
- CAO, W. *et al.* Sorbitol can fuel mouse sperm motility and protein tyrosine phosphorylation via sorbitol dehydrogenase. **Biol Reprod** [S.I.], v. 80, n. 1, p. 124-33, 2009.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. *et al.* GC-MS analysis of headspace and liquid extracts for metabolomic differentiation of citrus Huanglongbing and zinc deficiency in leaves of 'Valencia' sweet orange from commercial groves. **Phytochem Anal** [S.I.], v. 22, n. 3, p. 236-46, 2011.
- CHANG, Y. M. *et al.* Effects of trait definition on genetic parameter estimates and sire evaluation for clinical mastitis with threshold models. **Animal Science** [S.I.], v. 79, p. 355-363, 2014.
- COHEN, D. J. *et al.* Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. **Int J Dev Biol** [S.I.], v. 52, n. 5-6, p. 737-42, 2008.

- COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol** [S.I.], v. 26, n. 12, p. 1367-72, 2008.
- DAGHIR, E.; MARKUSZEWSKI, M. J. Disposition of drugs of abuse and their metabolites in wastewater as a method of the estimation of drug consumption. **Curr Drug Metab** [S.I.], v. 11, n. 8, p. 629-38, 2010.
- DAPINO, D. G. *et al.* Dynamics of heparin-binding proteins on boar sperm. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 116, n. 3-4, p. 308-17, 2009.
- DE KONING, T. J. *et al.* L-serine in disease and development. **Biochem J** [S.I.], v. 371, n. Pt 3, p. 653-61, 2003.
- DE SOUZA, F. F.; BARRETO, C. S.; LOPES, M. D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. **Theriogenology** [S.I.], v. 68, n. 1, p. 100-6, 2007.
- DIAS, J. M. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of aSFP, a bovine seminal plasma protein with a single CUB domain architecture. **Protein Sci** [S.I.], v. 6, n. 3, p. 725-7, 1997.
- DIETZ, R. W.; FLIPSE, R. J. Metabolism of bovine semen. XX. Role of ammonia in interactions between the citric acid and urea cycles. **Biol Reprod** [S.I.], v. 1, n. 2, p. 200-6, 1969.
- DONATO, R. *et al.* Functions of S100 proteins. **Curr Mol Med** [S.I.], v. 13, n. 1, p. 24-57, 2013.
- DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **Int J Biochem Cell Biol** [S.I.], v. 33, n. 7, p. 637-68, 2001.
- DONG, H. J. *et al.* Effect of dietary supplementation with amino acids on boar sperm quality and fertility. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 172, p. 182-9, 2016.
- DOTY, A. *et al.* Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. **Biol Reprod** [S.I.], v. 85, n. 1, p. 157-64, 2011.
- DOWNEY, B. R. Regulation of the estrous cycle in domestic animals - a review. **Can Vet J** [S.I.], v. 21, n. 11, p. 301-6, 1980.
- DOWSETT, K. F.; PATTIE, W. A. Collection of semen from stallions at stud. **Aust Vet J** [S.I.], v. 56, n. 8, p. 373-8, 1980.
- DRUART, X. *et al.* Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **J Proteomics** [S.I.], v. 91, p. 13-22, 2013.

- EINSPANIER, R. *et al.* Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. **FEBS Lett** [S.I.], v. 344, n. 1, p. 61-4, 1994.
- EINSPANIER, R. *et al.* Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. **Biochem Biophys Res Commun** [S.I.], v. 179, n. 2, p. 1006-10, 1991.
- FUKUDA, T. *et al.* Seminal level of clusterin in infertile men as a significant biomarker reflecting spermatogenesis. **Andrologia** [S.I.], v. 48, n. 10, p. 1188-1194, 2016.
- GALANTINO-HOMER, H. L. *et al.* Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalinization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. **Mol Reprod Dev** [S.I.], v. 67, n. 4, p. 487-500, 2004.
- GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. **Physiol Rev** [S.I.], v. 82, n. 2, p. 331-71, 2002.
- GILANY, K. *et al.* Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. **Mol Reprod Dev** [S.I.], v. 81, n. 1, p. 84-6, 2014.
- GONZALEZ-CADAVID, V. *et al.* Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology** [S.I.], v. 82, n. 5, p. 697-707, 2014.
- GOOD, N. E. *et al.* Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry** [S.I.], v. 5, n. 2, p. 467-77, 1966.
- GOODSON, S. G. *et al.* Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. **Biol Reprod** [S.I.], v. 87, n. 3, p. 75, 2012.
- HOSSAIN, M. S. *et al.* Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. **Reproductive Medicine and Biology** [S.I.], v. 6, n. 4, p. 235-239, 2007.
- HUANG, X. Y.; SHA, J. H. Proteomics of spermatogenesis: from protein lists to understanding the regulation of male fertility and infertility. **Asian J Androl** [S.I.], v. 13, n. 1, p. 18-23, 2011.
- ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian J Androl** [S.I.], v. 14, n. 6, p. 816-21, 2012.
- INSENER, M. *et al.* F. Proteomic and metabolomic approaches to the study of polycystic ovary syndrome. **Mol Cell Endocrinol** [S.I.], v. 370, n. 1-2, p. 65-77, 2013.
- INTASQUI, P. *et al.* Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. **BJU Int** [S.I.], v. 112, n. 6, p. 835-43, 2013.
- IRVIN, R. T.; MACALISTER, T. J.; COSTERTON, J. W. Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer modification of Escherichia coli outer membrane permeability. **J Bacteriol** [S.I.], v. 145, n. 3, p. 1397-403, 1981.

- ISHIKAWA, Y.; MIZUNO, K.; BACHINGER, H. P. Ziploc-ing the structure 2.0: Endoplasmic reticulum-resident peptidyl prolyl isomerases show different activities toward hydroxyproline. **J Biol Chem** [S.I.], v. 292, n. 22, p. 9273-9282, 2017.
- IZUMI, Y. *et al.* L-serine production by a methylotroph and its related enzymes. **Appl Microbiol Biotechnol** [S.I.], v. 39, n. 4-5, p. 427-32, 1993.
- JACKSON, E. *et al.* Expression, Purification, and Antimicrobial Activity of S100A12. **J Vis Exp** [S.I.], n. 123, 2017.
- JHA, K. N.; SHIVAJI, S. Protein serine and threonine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in in vitro capacitated hamster spermatozoa. **Mol Reprod Dev** [S.I.], v. 63, n. 1, p. 119-30, 2002.
- JIMENEZ-RABADAN, P. *et al.* Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 167, p. 103-8, 2016.
- JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **J Androl** [S.I.], v. 33, n. 4, p. 536-51, 2012.
- KIM, S. C.; KIM, H. W. Effects of nitrogenous components of urine on sperm motility: an in vitro study. **Int J Androl** [S.I.], v. 21, n. 1, p. 29-33, 1998.
- KING, T. E.; MANN, T. Sorbitol dehydrogenase in spermatozoa. **Nature** [S.I.], v. 182, n. 4639, p. 868-9, 1958.
- KIRCHHOFF, C. *et al.* Function of human epididymal proteins in sperm maturation. **Andrologia** [S.I.], v. 30, n. 4-5, p. 225-32, 1998.
- KOBAYASHI, T. *et al.* Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. **J Androl** [S.I.], v. 23, n. 5, p. 674-83, 2002.
- KOPPERS, A. J.; REDDY, T.; O'BRYAN, M. K. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. **Asian J Androl** [S.I.], v. 13, n. 1, p. 111-7, 2011.
- KOSANOVIC, M. M.; JANKOVIC, M. M. Molecular heterogeneity of gelatin-binding proteins from human seminal plasma. **Asian J Androl** [S.I.], v. 12, n. 3, p. 363-75, 2010.
- KOUADJO, K. E. *et al.* Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. **BMC Genomics** [S.I.], v. 8, p. 127, 2007.
- KOVAC, J. R.; PASTUSZAK, A. W.; LAMB, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertil Steril** [S.I.], v. 99, n. 4, p. 998-1007, 2013.

- KRAUS, M.; TICHA, M.; JONAKOVA, V. Heparin-binding proteins of human seminal plasma homologous with boar spermadhesins. **J Reprod Immunol** [S.I.], v. 51, n. 2, p. 131-44, 2001.
- KREBS, H. A. Urea formation in mammalian liver. **Biochem J** [S.I.], v. 36, n. 10-12, p. 758-67, 1942.
- KRISHNAKUMAR, S. *et al.* A Preliminary Assessment of the Effects of Reproductive Seasonality on Seminal Plasma Characteristics in North American Bison (Bison Bison). **J Zoo Wildl Med** [S.I.], v. 48, n. 1, p. 91-101, 2017.
- KUMAR, A. *et al.* Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: 1H nuclear magnetic resonance analysis. **Mol Reprod Dev** [S.I.], v. 82, n. 2, p. 123-31, 2015.
- KUMAR, R. D. *et al.* Semen Metabolomics as biomarker for reproductive efficiency in Dairy animals. **Indian Farmer** [S.I.], v. 7, n. 2, p. 537-42, 2015.
- KUMAR, S. *et al.* Gelatin Binding Proteins in Reproductive Physiology. **Indian J Microbiol** [S.I.], v. 56, n. 4, p. 383-393, 2016.
- KUMAR, V. *et al.* Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. **J Biosci** [S.I.], v. 34, n. 6, p. 899-908, 2009.
- KURITA-OCHIAI, T. *et al.* Cellular events involved in butyric acid-induced T cell apoptosis. **J Immunol** [S.I.], v. 171, n. 7, p. 3576-84, 2003.
- KURITA-OCHIAI, T. *et al.* Characterization of the effects of butyric acid on cell proliferation, cell cycle distribution and apoptosis. **FEMS Immunol Med Microbiol** [S.I.], v. 47, n. 1, p. 67-74, 2006.
- KWON, W. S. *et al.* Discovery of predictive biomarkers for litter size in boar spermatozoa. **Mol Cell Proteomics** [S.I.], v. 14, n. 5, p. 1230-40, 2015.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol** [S.I.], v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.
- LENZ, R. W. *et al.* Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. **Biol Reprod** [S.I.], v. 28, n. 3, p. 683-90, 1983.
- LU, R. *et al.* Protective effect of Annexin 5 on human sperm membrane and DNA integrity]. **Zhonghua Nan Ke Xue** [S.I.], v. 17, n. 1, p. 17-20, 2011.
- LUNA, C. *et al.* Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm-zona pellucida interaction. **Theriogenology** [S.I.], v. 83, n. 4, p. 670-8, 2015.

- MADEJ, M. *et al.* Heparin-binding proteins from boar seminal plasma affecting the release of prostaglandins and interleukin-6 by porcine endometrial and cervical cells and bovine endometrial cells. **Natural Science** [S.I.], v. 5, n. 7, p. 21-30, 2013.
- MAHRAN, A. M.; KHOLEF, E. F. M. In-vitro effect of γ -amino butyric acid and progesterone on sperm motility and acrosome reaction in patients with varicocele before and after varicocelectomy. **Human Andrology** [S.I.], v. 4, n. 2, p. 30-33, 2014.
- MANJUNATH, P. *et al.* Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biol Reprod** [S.I.], v. 50, n. 1, p. 27-37, 1994.
- MANJUNATH, P. *et al.* New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biol Reprod** [S.I.], v. 80, n. 3, p. 394-7, 2009.
- MANJUNATH, P. *et al.* Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Biosci Rep** [S.I.], v. 7, n. 3, p. 231-8, 1987.
- MARIN, S. *et al.* Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS Lett** [S.I.], v. 554, n. 3, p. 342-6, 2003.
- MARTINEZ-SOTO, J. C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology** [S.I.], v. 1, n. 3, p. 365-75, 2013.
- MARTINS, J. A. M. *et al.* Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminant Research** [S.I.], v. 113, p. 115-127, 2013.
- MELO, L. M. *et al.* Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. **Mol Reprod Dev** [S.I.], v. 75, n. 1, p. 8-16, 2008.
- MELO, L. M. *et al.* Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 110, n. 3-4, p. 245-55, 2009.
- MOR, V. *et al.* A heparin-binding membrane protein from goat spermatozoa immobilizes spermatozoa in the presence of complement. **Fertil Steril** [S.I.], v. 85 Suppl 1, p. 1142-9, 2006.
- MORI, M. *et al.* Synthesis, intracellular transport and processing of mitochondrial urea cycle enzymes. **Adv Enzyme Regul** [S.I.], v. 21, p. 121-32, 1983.
- MUNOZ, M. *et al.* Metabolomic prediction of pregnancy viability in superovulated cattle embryos and recipients with fourier transform infrared spectroscopy. **Biomed Res Int** [S.I.], v. 2014, p. 608579, 2014.
- NAKANO, Y. *et al.* Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. **J Biochem** [S.I.], v. 120, n. 4, p. 803-12, 1996.

NAUGHTON, C. K.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J., JR. Development of an inexpensive artificial vagina for semen collection from rabbits. **J Androl** [S.I.], v. 24, n. 5, p. 712-5, 2003.

NAZ, R. K. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. **Biol Reprod** [S.I.], v. 60, n. 6, p. 1402-9, 1999.

NAZ, R. K.; RAJESH, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. **Reprod Biol Endocrinol** [S.I.], v. 2, p. 75, 2004.

NAZ, S. *et al.* Analytical protocols based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. **Bioanalysis** [S.I.], v. 6, n. 12, p. 1657-77, 2014.

NAZZARO-PORRO, M. Azelaic acid. **J Am Acad Dermatol**, v. 17, n. 6, p. 1033-41, 1987.

NEILL, A. R.; MASTERS, C. J. Metabolism of fatty acids by bovine spermatozoa. **Biochem J** [S.I.], v. 127, n. 2, p. 375-85, 1972.

NEWMAN, A. C.; MADDOCKS, O. D. K. One-carbon metabolism in cancer. **Br J Cancer** [S.I.], v. 116, n. 12, p. 1499-1504, 2017.

NIASARI-NASLAJI, A. *et al.* Effectiveness of a tris-based extender (SHOTOR diluent) for the preservation of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) semen. **Cryobiology** [S.I.], v. 53, n. 1, p. 12-21, 2006.

NOVAK, S. *et al.* Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. **J Androl** [S.I.], v. 31, n. 2, p. 188-200, 2010.

O'BRYAN, M. K. *et al.* Immunohistological localization of clusterin in the male genital tract in humans and marmosets. **Biol Reprod** [S.I.], v. 50, n. 3, p. 502-9, 1994.

PAIVA, C. *et al.* Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance ((1)H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Andrology** [S.I.], v. 3, n. 3, p. 496-505, 2015.

PANKHURST, G. J.; BENNETT, C. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin. **Biochemistry**, v. 37, n. 14, p. 4823-30, 1998.

PASSI, S. *et al.* The oxyradical-scavenging activity of azelaic acid in biological systems. **Free Radic Res Commun** [S.I.], v. 15, n. 1, p. 17-28, 1991.

PATEL, M. *et al.* Seminal Plasma Heparin Binding Proteins Improve Semen Quality by Reducing Oxidative Stress during Cryopreservation of Cattle Bull Semen. **Asian-Australas J Anim Sci** [S.I.], v. 29, n. 9, p. 1247-55, 2016.

PEMBERTON, T. J.; KAY, J. E. Identification and comparative analysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires of *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *Sz. pombe*. **Comp Funct Genomics** [S.I.], v. 6, n. 5-6, p. 277-300, 2005.

- PENNA, G. *et al.* Seminal plasma cytokines and chemokines in prostate inflammation: interleukin 8 as a predictive biomarker in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and benign prostatic hyperplasia. **Eur Urol** [S.I.], v. 51, n. 2, p. 524-33; discussion 533, 2007.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol** [S.I.], v. 109, n. 2, p. 347-52, 1995.
- PICKART, C. M.; EDDINS, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. **Biochim Biophys Acta** [S.I.], v. 1695, n. 1-3, p. 55-72, 2004.
- PUENTE, M. A.; TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Bull sperm acrosome reaction induced by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABAergic receptors type A. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 127, n. 1-2, p. 31-7, 2011.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research** [S.I.], n. 63, p. 215-225, 2006.
- QIAO, S. *et al.* Seminal plasma metabolomics approach for the diagnosis of unexplained male infertility. **PLoS One** [S.I.], v. 12, n. 8, p. e0181115, 2017.
- QIU, J. H. *et al.* Effects of glucose metabolism pathways on sperm motility and oxidative status during long-term liquid storage of goat semen. **Theriogenology** [S.I.], v. 86, n. 3, p. 839-49, 2016.
- RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. **Anal Chem** [S.I.], v. 75, n. 3, p. 663-70, 2003.
- REGO, J. P. *et al.* Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 148, n. 1-2, p. 1-17, 2014.
- REINERT, M.; *et al.* Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **Eur J Biochem** [S.I.], v. 242, n. 3, p. 636-40, 1996.
- RENGAN, A. K.; AGARWAL, A.; VAN DER LINDE, M.; DU PLESSIS, S. S. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. **Reprod Biol Endocrinol** [S.I.], v. 10, p. 92, 2012.
- RODRIGUEZ-VILLAMIL, P. *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** [S.I.], v. 85, n. 3, p. 540-54, 2016.
- ROHWEDDER, A. *et al.* Lipid droplet formation in response to oleic acid in Huh-7 cells is mediated by the fatty acid receptor FFAR4. **J Cell Sci** [S.I.], v. 127, n. Pt 14, p. 3104-15, 2014.

ROSE, C. *et al.* The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. **Crit Rev Environ Sci Technol** [S.I.], v. 45, n. 17, p. 1827-1879, 2015.

ROY, S. C.; GHOSH, J. Dynamic in vivo changes in the activities of gelatinases, matrix metalloproteinases (MMPs), and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in buffalo (*Bubalus bubalis*) uterine luminal fluid during estrous cycle and early pregnancy. **Mol Reprod Dev** [S.I.], v. 77, n. 11, p. 944-53, 2010.

SAACKE, R. G. *et al.* Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 60-61, p. 663-77, 2000.

SANKHALA, R. S. *et al.* HSP-1/2, a major protein of equine seminal plasma, exhibits chaperone-like activity. **Biochem Biophys Res Commun** [S.I.], v. 427, n. 1, p. 18-23, 2012.

SCHALLREUTER, K. U.; WOOD, J. M. Azelaic acid as a competitive inhibitor of thioredoxin reductase in human melanoma cells. **Cancer Lett** [S.I.], v. 36, n. 3, p. 297-305, 1987.

SCHEIT, K. H. *et al.* The major protein of bull seminal plasma: biosynthesis and biological function. **Biosci Rep** [S.I.], v. 8, n. 6, p. 589-608, 1988.

SCHROTER, F. *et al.* Recombinant expression of porcine spermadhesin AWN and its phospholipid interaction: Indication for a novel lipid binding property. **Reprod Domest Anim** [S.I.], v. 52, n. 4, p. 585-595, 2017.

SELI, E. *et al.* Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. **Fertil Steril** [S.I.], v. 94, n. 2, p. 535-42, 2010.

SHARKEY, D. J. *et al.* Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. **Mol Hum Reprod** [S.I.], v. 13, n. 7, p. 491-501, 2007.

SHI, Q. X.; YUAN, Y. Y.; ROLDAN, E. R. gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. **Mol Hum Reprod** [S.I.], v. 3, n. 8, p. 677-83, 1997.

SHIPLEY, C. F. Breeding soundness examination of the boar. **Swine Health Prod** [S.I.], v. 7, n. 3, p. 117-120, 1999.

SILVA, S. V. *et al.* Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 137, n. 1-2, p. 37-44, 2013.

SINGH, A. K.; BRAR, P. S.; CHEEMA, R. S. Identification of Heparin Binding Proteins in Frozen-thawed Capacitated/Acrosome-reacted Spermatozoa and Their Relationship with Fertility of Buffalo Bull Semen. **International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology** [S.I.], v. 5, n. 1, p. 211-216, 2016.

SINGH, R.; SINCLAIR, K. D. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S56-62, 2007.

SNEL, B. *et al.* STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. **Nucleic Acids Res [S.I.]**, v. 28, n. 18, p. 3442-4, 2000.

SOUZA, C. E. *et al.* Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **J Proteomics [S.I.]**, v. 75, n. 14, p. 4436-56, 2012.

SPECTOR, A. A.; YOREK, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. **J Lipid Res [S.I.]**, v. 26, n. 9, p. 1015-35, 1985.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Bovine seminal PDC-109 protein: an overview of biochemical and functional properties. **Anim Reprod Sci [S.I.]**, v. 138, n. 1-2, p. 1-13, 2013.

SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Hum Reprod Update [S.I.]**, v. 12, n. 1, p. 23-37, 2006.

SUTOVSKY, P. *et al.* A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **J Cell Sci [S.I.]**, v. 114, n. Pt 9, p. 1665-75, 2001.

SWEGEN, A. *et al.* Investigation of the stallion sperm proteome by mass spectrometry. **Reproduction [S.I.]**, v. 149, n. 3, p. 235-44, 2015.

TANG, B. *et al.* Metabonomic analysis of fatty acids in seminal plasma between healthy and asthenozoospermic men based on gas chromatography mass spectrometry. **Andrologia [S.I.]**, 2017.

TAO, X. Q. *et al.* Expression of rat annexin 5 and its effect on human sperm motility in vitro]. **Zhonghua Nan Ke Xue [S.I.]**, v. 16, n. 5, p. 400-4, 2010.

TEIXEIRA, D. I. *et al.* Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. **Genet Mol Res [S.I.]**, v. 5, n. 1, p. 79-87, 2006.

THERIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biol Reprod [S.I.]**, v. 57, n. 5, p. 1080-8, 1997.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology [S.I.]**, v. 57, n. 3, p. 1087-94, 2002.

TOPFER-PETERSEN, E. *et al.* Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia [S.I.]**, v. 30, n. 4-5, p. 217-24, 1998.

- TRIVEDI, D. K. *et al.* Meat, the metabolites: an integrated metabolite profiling and lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef with pork. **Analyst** [S.I.], v. 141, n. 7, p. 2155-64, 2016.
- TSUGAWA, H. *et al.* GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). **BMC Bioinformatics** [S.I.], v. 12, p. 131, 2011.
- TSURUOKA, M. *et al.* Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients. **Electrophoresis** [S.I.], v. 34, n. 19, p. 2865-72, 2013.
- ULBRICH, S. E. *et al.* Bovine endometrial metalloproteinases MMP14 and MMP2 and the metalloproteinase inhibitor TIMP2 participate in maternal preparation of pregnancy. **Mol Cell Endocrinol** [S.I.], v. 332, n. 1-2, p. 48-57, 2011.
- VAN TILBURG, M. F. *et al.* Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3 degrees S). **Int J Biometeorol** [S.I.], v. 59, n. 5, p. 561-73, 2015.
- VARNER, D. D.; BOWEN, J. A.; JOHNSON, L. Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. **Arch Androl** [S.I.], v. 31, n. 3, p. 199-207, 1993.
- VIGODNER, M. Roles of small ubiquitin-related modifiers in male reproductive function. **Int Rev Cell Mol Biol** [S.I.], v. 288, p. 227-59, 2011.
- VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reprod Biol Endocrinol** [S.I.], v. 1, p. 39, 2003.
- WATFORD, M. The urea cycle: a two-compartment system. **Essays Biochem** [S.I.], v. 26, p. 49-58, 1991.
- WEMPE, F.; EINSPIANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. **Biochem Biophys Res Commun** [S.I.], v. 183, n. 1, p. 232-7, 1992.
- WIEMELS, R. E. *et al.* An Intracellular Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase Is Required for Folding and Activity of the Staphylococcus aureus Secreted Virulence Factor Nuclease. **J Bacteriol** [S.I.], v. 199, n. 1, 2017.
- WISHART, D. S. *et al.* HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. **Nucleic Acids Res** [S.I.], v. 41, n. Database issue, p. D801-7, 2013.
- WISHART, D. S. *et al.* HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Res** [S.I.], v. 35, n. Database issue, p. D521-6, 2007.

WITHERS, P. C. Urea: diverse functions of a 'waste' product. **Clin Exp Pharmacol Physiol** [S.I.], v. 25, n. 9, p. 722-7, 1998.

WITT, D. P.; LANDER, A. D. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. **Curr Biol** [S.I.], v. 4, n. 5, p. 394-400, 1994.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Curr Protoc Bioinformatics** [S.I.], v. 55, p. 14.10.1-14.10.91, 2016.

YADAV, V. K. *et al.* Heparin and heparin binding proteins: potential relevance to reproductive physiology. **Curr Protein Pept Sci** [S.I.], v. 14, n. 1, p. 61-9, 2013.

YANG, M.; VOUSDEN, K. H. Serine and one-carbon metabolism in cancer. **Nat Rev Cancer** [S.I.], v. 16, n. 10, p. 650-62, 2016.

YIN, Z. *et al.* Increased MMPs expression and decreased contraction in the rat myometrium during pregnancy and in response to prolonged stretch and sex hormones. **Am J Physiol Endocrinol Metab** [S.I.], v. 303, n. 1, p. E55-70, 2012.

YU, I. J. Canine sperm cryopreservation using glucose in glycerol-free Tris. **Cryo Letters** [S.I.], v. 35, n. 2, p. 101-7, 2014.

YUE, W. *et al.* Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of ram seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. **Anim Reprod Sci** [S.I.], v. 116, n. 3-4, p. 386-91, 2009.

ZHANG, A. *et al.* Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. **J Proteomics** [S.I.], v. 75, n. 4, p. 1079-88, 2012.

ZHANG, S. *et al.* Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. **J Anim Sci Biotechnol** [S.I.], v. 8, p. 10, 2017.

ZWALD, N. R. *et al.* Genetic selection for health traits using producer-recorded data. I. Incidence rates, heritability estimates, and sire breeding values. **J Dairy Sci** [S.I.], v. 87, n. 12, p. 4287-94, 2004a.

ZWALD, N. R. *et al.* Genetic selection for health traits using producer-recorded data. II. Genetic correlations, disease probabilities, and relationships with existing traits. **J Dairy Sci** [S.I.], v. 87, n. 12, p. 4295-302, 2004b.

ANEXOS

ANEXO A – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE BOVINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2	P3
G3N2D7	12 kDa protein	IPLL1			
F1N076	121 kDa protein	CP			
P68250	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB			
P62261	14-3-3 protein epsilon	YWHAE			
Q0VC36	14-3-3 protein sigma	SFN			
P63103	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ			
Q76181	40S ribosomal protein S12	RPS12			
Q3ZBH8	40S ribosomal protein S20	RPS20			
Q3ZBZ1	45 kDa calcium-binding protein	SDF4			
Q05927	5-nucleotidase	NT5E			
G3MZC1	5-nucleotidase	NT5E			
P31081	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1			
Q0VCX2	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5			
F1MQX0	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACSS1			
Q17QB3	Acid ceramidase	ASAH1			
P20004	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2			
P63258	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1			
P07107	Acyl-CoA-binding protein	DBI			
P00570	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1			
A6QLB7	Adenylyl cyclase-associated protein	CAP1			
Q5E962	Aldo-keto reductase family 1, member B1	AKR1B1			
Q5GN72	Alpha-1-acid glycoprotein	agp			
P34955	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1			
Q2KJF1	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG			
P28800	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2			
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG			
Q7SIH1	Alpha-2-macroglobulin	A2M			
F1MRD4	Alpha-actinin-2	ACTN2			

A5D7D1	Alpha-actinin-4	ACTN4			
Q9XSJ4	Alpha-enolase	ENO1			
G5E5M8	Alpha-mannosidase	LOC532207			
E1BHP0	Alpha-mannosidase	MAN2B2			
P02662	Alpha-S1-casein	CSN1S1			
P02663	Alpha-S2-casein	CSN1S2			
Q08E54	Amyloid beta (A4) protein	APP			
Q2NKV1	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	ANG			
P80929	Angiogenin-2	ANG2			
F1MQJ0	Angiotensin-converting enzyme	ACE			
P46193	Annexin A1	ANXA1			
P04272	Annexin A2	ANXA2			
V6F9A2	Apolipoprotein A-I	APOA1			
Q32PJ2	Apolipoprotein A-IV	APOA4			
Q08DD1	Arylsulfatase A	ARSA			
F1MLB8	ATP synthase subunit alpha	ATP5A1			
P00829	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B			
Q9MZ08	Basal cell adhesion molecule	BCAM			
Q3ZBX0	Basigin	BSG			
P01888	Beta-2-microglobulin	B2M			
P02666	Beta-casein	CSN2			
Q58D55	Beta-galactosidase	GLB1			
A3KMY8	Beta-glucuronidase	GUSB			
E1B9E8	Beta-hexosaminidase	N/A			
H7BWW2	Beta-hexosaminidase	HEXB			
Q5I597	Betaine--homocysteine S- methyltransferase 1	BHMT			
P02754	Beta-lactoglobulin	LGB			
A6QLB0	Beta-mannosidase	MANBA			
P13600	Beta-nerve growth factor	NGF			
P30122	Bile salt-activated lipase	CEL			
Q8SPU5	BPI fold-containing family A member 1	BPIFA1			
F1MLW2	BPI fold-containing family B member 1	BPIFB1			
Q3SX46	C1GALT1-specific chaperone 1	C1GALT1C1			
A5PJL8	C1QTNF5 protein	C1QTNF5			
F1N619	Cadherin-1	CDH1			
P62157	Calmodulin	CALM			
P06833	Caltrin	PYY2			
P00517	cAMP-dependent protein	PRKACA			

	kinase catalytic subunit alpha				
P00515	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	PRKAR2A			
P00921	Carbonic anhydrase 2	CA2			
E1BN79	Carboxylic ester hydrolase	CES5A			
Q17QK3	Carboxypeptidase Q	CPQ			
P22226	Cathelicidin-1	CATHL1			
P19660	Cathelicidin-2	CATHL2			
P33046	Cathelicidin-4	CATHL4			
P56425	Cathelicidin-7	CATHL7			
P07688	Cathepsin B	CTSB			
F1MMR6	Cathepsin D	CTSD			
Q0VCU3	Cathepsin F	CTSF			
Q5E998	Cathepsin L2	CTSV			
P25326	Cathepsin S	CTSS			
P28291	C-C motif chemokine 2	CCL2			
F1MHN8	CD166 antigen	ALCAM			
Q29423	CD44 antigen	CD44			
Q1ZYR0	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5	CLN5			
A6QLI4	CHODL protein	CHODL			
Q29RK1	Citrate synthase, mitochondrial	CS			
P17697	Clusterin	CLU			
F1MWI1	Clusterin	N/A			
Q28107	Coagulation factor V	F5			
Q5E9F7	Cofilin-1	CFL1			
P02453	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1			
P02465	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2			
Q3SYW2	Complement C2	C2			
Q2UVX4	Complement C3	C3			
P81187	Complement factor B	CFB			
Q28085	Complement factor H	CFH			
Q28106	Contactin-1	CNTN1			
Q9XSC6	Creatine kinase M-type	CKM			
P55206	C-type natriuretic peptide	NPPC			
A7MBJ5	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	CAND1			
B8Y9T0	Cumulus cell-specific fibronectin 1 transcript variant	FN1			
Q29RH0	Cystatin-9	CST-9			
F6QEL0	Cystatin-B	CST6			
Q3ZC84	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2			

P56541	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNASE2			
Q3ZCJ8	Dipeptidyl peptidase 1	CTSC			
P81425	Dipeptidyl peptidase 4	DPP4			
P23196	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1			
Q27968	DnaJ homolog subfamily C member 3	DNAJC3			
E1B7E2	Dynein light chain 2, cytoplasmic	DOCK3			
Q3MHR3	Dynein light chain 2, cytoplasmic	DYNLL2			
O18738	Dystroglycan	DAG1			
A5PJT7	ECM1 protein	ECM1			
A6QPP7	ELA2 protein	ELA2			
P68103	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1			
Q5E983	Elongation factor 1-beta	EEF1B			
P49410	Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM			
A6QPT7	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	ERAP2			
Q95M18	Endoplasmic reticulum chaperone protein	HSP90B1			
Q3ZC64	Ephrin-A1	EFNA1			
A1L570	Ephrin-B1	EFNB1			
P79345	Epididymal secretory protein E1	NPC2			
P50448	Factor XIIIa inhibitor	N/A			
O46414	Ferritin heavy chain	FTH1			
P02672	Fibrinogen alpha chain	FGA			
P02676	Fibrinogen beta chain	FGB			
F1MGU7	Fibrinogen gamma-B chain	FGG			
Q5EA62	Fibulin-5	FBLN5			
P20930	Filaggrin	FLG			
Q5D862	Filaggrin-2	FLG2			
Q3T173	Four and a half LIM domains 1	FHL1			
Q3SZB7	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1			
A6QLL8	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA			
A7E3W2	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP			
A7YWG4	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH			
Q863C3	Gastrin-releasing peptide	GRP			
Q3SX14	Gelsolin	GSN			
Q32LB5	GLIPR1-like protein 1	GLIPR1L1			
Q3ZBD7	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI			
Q2KHZ8	Glucosylceramidase	GBA			
Q28120	Glutamyl-peptide cyclotransferase	QPCT			

Q32LQ0	Glutamyl aminopeptidase	ENPEP			
G3X8D7	Glutathione peroxidase	GPX3			
F1MCF5	Glutathione peroxidase	GPX6			
G3N2N9	Glutathione peroxidase	GPX5			
P10096	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH			
Q2TBU0	Haptoglobin	HP			
Q2TBX4	Heat shock 70 kDa protein 13	HSPA13			
Q27975	Heat shock 70 kDa protein 1A	HSPA1A			
P0CB32	Heat shock 70 kDa protein 1-like	HSPA1L			
A7E3S8	Heat shock 70kD protein binding	ST13			
P19120	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8			
Q76LV2	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1			
Q76LV1	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1			
P34933	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2			
P01966	Hemoglobin subunit alpha	HBA			
P02070	Hemoglobin subunit beta	HBB			
Q3SZV7	Hemopexin	HPX			
Q3SZV7	Hemopexin	HPX			
Q5W5U3	Hexokinase	HK1			
Q8SQ21	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	HINT2			
Q3ZBX9	Histone H2A.J	H2AFJ			
Q32S29	Histone H2B	H2B			
Q5E9F8	Histone H3.3	H3F3A			
G3X807	Histone H4	LOC781223			
Q5E949	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 2 isoform 3	HRMT1L2			
Q86YZ3	Hornerin	HRNR			
F1MTV1	Hyaluronidase	SPAM1			
P20959	Insulin-like growth factor-binding protein 3	IGFBP3			
Q3T0P7	Integral membrane protein 2B	ITM2B			
Q2TBX9	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 1	ITFG1			
Q3T052	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4			
Q9XSG3	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1			
Q14CN4	Isoform 1 of Keratin, type II cytoskeletal 72	KRT72			

P02768	Isoform 1 of Serum albumin precursor	ALB			
Q8N1N4-2	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 78	KRT78			
Q8SPJ1	Junction plakoglobin	JUP			
P06394	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10			
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10			
F1MC11	Keratin, type I cytoskeletal 14	KRT14			
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16	KRT16			
K1C17	Keratin, type I cytoskeletal 17	KRT17 P			
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9			
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1			
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2			
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5	KRT5			
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	KRT6A			
Q95114	Lactadherin	MFGE8			
G3MXZ0	Lactoperoxidase	LPO			
P24627	Lactotransferrin	LTF			
Q95M12	Legumain	LGMN			
Q1JPB0	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1			
E1BNS9	L-lactate dehydrogenase	LDHC			
Q5E9B1	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB			
A5PJH7	LOC788112 protein	LOC788112			
F1N0R8	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	SDS			
Q9MYM4	Lysosomal alpha-glucosidase	GAA			
Q29451	Lysosomal alpha-mannosidase	MAN2B1			
Q3MI05	Lysosomal protective protein	CTSA			
Q2TA14	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP			
Q1JQA0	Lysosomal thioesterase PPT2	PPT2			
A0JNM6	Lysozyme-like protein 1	LYZL1			
Q8MJ24	Lysyl oxidase homolog 4	LOXL4			
Q32LG3	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2			
A6QLI0	Mammalian ependymin-related protein 1	EPDR1			
Q08E55	MBTPS1 protein	MBTPS1			
P16368	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2			
A6QPW2	MGC157332 protein	MGC157332			
P19879	Mimecan	OGN			
E1B941	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	PMPCB			
A6QP39	MSLN protein	MSLN			

Q7YS82	Myoblast determination protein 1	MYOD1			
P02192	Myoglobin	MB			
A0JNJ5	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	MYL1			
Q9BE40	Myosin-1	MYH1			
Q9BE41	Myosin-2	MYH2			
Q1LZH9	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	GNS			
P14769	N-acetyllactosaminide alpha-1,3-galactosyltransferase	GGTA1			
F1MCE4	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	LOC407148			
A6QM01	NAGLU protein	NAGLU			
Q0IIH5	Nucleobindin 2	NUCB2			
Q0P569	Nucleobindin-1	NUCB1			
P52175	Nucleoside diphosphate kinase A 2	NME1-2			
Q3T0Q4	Nucleoside diphosphate kinase B	NME2			
Q0VCP3	Olfactomedin-like protein 3	OLFML3			
Q0IIH3	Oligodendrocyte myelin glycoprotein	OMG			
F1MI46	Osteopontin	SPP1			
Q2T9U2	Outer dense fiber protein 2	ODF2			
P45478	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1			
M5FKI8	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like	LOC100295702			
Q58CQ9	Pantetheinase	VNN1			
A4IFC0	PDGFD protein	PDGFD			
A1A4Q6	Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	PI3			
Q8SPP7	Peptidoglycan recognition protein 1	PGLYRP1			
P62935	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA			
P80311	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B PPIB	PPIB			
P18203	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A			
Q9BGI1	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5			
P13696	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1			
Q3T010	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4	PEBP4			
Q3T0P6	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1			
Q3SZ62	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1			
Q32KV0	Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2			
Q2T9S4	Phosphoglycolate phosphatase	PGP			

V6F953	Placenta-expressed transcript 1 protein	PLET1			
Q9N212	Plasma serine protease inhibitor	SERPINA5			
Q28017	Platelet-activating factor acetylhydrolase	PLA2G7			
A0JN47	PLXDC2	Plexin domain containing 2			
Q3SYT9	Poly(RC) binding protein 2	PCBP2			
G5E6M1	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR			
P81265	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR			
F1N554	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT10			
Q6QRN7	PP1201 protein	RECS1			
Q29437	Primary amine oxidase, liver isozyme	N/A			
Q3T0I2	Pro-cathepsin H	CTSH			
O77588	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1			
P02584	Profilin-1	PFN1			
Q3ZBH5	Proliferation-associated 2G4, 38kDa	PA2G4			
P26779	Prosaposin	PSAP			
O02853	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS			
G5E5C3	Proteasome subunit alpha type	PSMA6			
E1BD83	Proteasome subunit alpha type	PSMA8			
Q58DU5	Proteasome subunit alpha type-3	PSMA3			
Q3ZCK9	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4			
Q2TBX6	Proteasome subunit beta type-1	PSMB1			
Q32KL2	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5			
F1MTI7	Protein CutA	CUTA			
Q5E946	Protein deglycase DJ-1	PARK7			
P05307	Protein disulfide-isomerase	P4HB			
P38657	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3			
A5PKI3	Protein FAM3C	FAM3C			
P79105	Protein S100-A12	S100A12			
P10462	Protein S100-A2	S100A2			
P28782	Protein S100-A8	S100A8			
E1BLI9	Protein S100-A9	S100A9			
F1MME1	Protein-tyrosine-phosphatase	PTPRK			
Q2KIY5	Putative phospholipase B-like 2	PLBD2			
A5D984	Pyruvate kinase	PKM2			
P21856	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI1			

Q3ZBD1	RAB1A, member RAS oncogene family	RAB1A			
Q148J4	RAB2A, member RAS oncogene family	RAB2A			
Q3MHP2	Ras-related protein Rab-11B	RAB11B			
A6QR46	Ras-related protein Rab-6B	RAB6B			
F1N7F3	Receptor protein-tyrosine kinase	EGFR			
Z4YHD9	Receptor protein-tyrosine kinase	MET			
P81134	Renin receptor	ATP6AP2			
Q58DT6	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDIA			
Q9TU03	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDIB			
P15467	Ribonuclease 4	RNASE4			
W0UV03	Ribonuclease A C1	RAC1			
Q0III8	RNASET2 protein	RNASET2			
F1N058	Ropporin-1	ROPN1			
A6QPK0	SCGB2A2 protein	SCGB2A2			
A0JNP2	Secretoglobin family 1D member	SCGB1D			
Q5EA85	Semaphorin-4A	SEMA4A			
P81019	Seminal plasma protein BSP-30 kDa	N/A			
P02784	Seminal plasma protein PDC-109	N/A			
Q2NKZ9	Serine carboxypeptidase 1	SCPEP1			
F1N152	Serine protease HTRA1	HTRA1			
Q2KJ44	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PPP2R4			
P61287	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC			
Q29443	Serotransferrin	TF			
Q9TTE1	Serpin A3-1	SERPINA3-1			
A0A0A0MP92	Serpin A3-7	SERPINA3-7			
A6QPQ2	Serpin A3-8	SERPINA3-8			
A6QPZ4	SERPINB4 protein	SERPINB4			
A6QPP2	SERPIND1 protein	SERPIND1			
P02769	Serum albumin	ALB			
A6QPY4	SGSH protein	SGSH			
A6BMK7	Sialidase-1	NEU1			
A5D960	Sialyltransferase 4A	ST3GAL1			
Q2HJF0	Similar to Serotransferrin	N/A			
Q08DL0	SLC3A2 protein	SLC3A2			
E1B8N5	Sodium/potassium-transporting	ATP1A4			

	ATPase subunit alpha				
P58352	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	SLC2A3			
Q58D31	Sorbitol dehydrogenase	SORD			
A6QQ77	Sperm acrosome membrane-associated protein 3	SPACA3			
P82292	Spermadhesin Z13	spadh2			
P29392	Spermadhesin-1	SPADH1			
Q0VD19	Sphingomyelin phosphodiesterase	SMPD1			
Q2KIW7	ST6GAL1 protein	ST6GAL1			
F1MM32	Sulfhydryl oxidase	QSOX1			
P00442	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1			
A8PVV5	SYPL1 protein	SYPL1			
Q32L40	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1			
F1N0E5	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4			
Q2NKZ1	T-complex protein 1 subunit eta	CCT7			
Q3T0K2	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3			
Q3ZC19	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8			
Q3MHL7	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A			
G8JKX6	Tetraspanin	CD9			
A6QPE3	TEX101 protein	TEX101			
Q28178	Thrombospondin-1	THBS1			
Q3SX33	Thy-1 cell surface antigen	THY1			
Q2KIM0	Tissue alpha-L-fucosidase	FUCA1			
Q58DR3	Transaldolase	TALDO1			
Q9XSC9	Transcobalamin-2	TCN2			
A7E3W4	Transketolase	TKT			
Q5E956	Triosephosphate isomerase	TPI1			
Q0V8B6	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1			
Q5E9T9	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB			
Q5KR47	Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3			
Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	TUBA3			
Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B			
P63048	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52			
Q32LF7	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4	B4GALT4			
P81401	VIP peptides	VIP			

Q3MHN5	Vitamin D-binding protein	GC			
Q32LB7	V-type proton ATPase subunit E 2	ATP6V1E2			
P40682	V-type proton ATPase subunit S1	ATP6AP1			
Q3ZCH5	Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1			

ANEXO B – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE CAPRINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2	P3
W5P303	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB			
P62262	14-3-3 protein epsilon	YWHAE			
W5PWD6	14-3-3 protein gamma	YWHAG			
P68253	14-3-3 protein gamma	YWHAG			
H9CJU6	14-3-3-1 protein zeta/delta	YWHAZ			
W5P7W0	45 kDa calcium-binding protein	SDF4			
W5PWG1	6-phosphofructokinase	PFKP			
P00349	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD			
D3Y602	A proliferation-inducing ligand	N/A			
W5P9I9	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACSS1			
W5QAA9	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2			
P10626	Acrosin	ACR			
W5QFL6	Acrosin	ACR			
P60713	Actin, cytoplasmic 1	ACTB			
W5PIJ2	Adenosyl homocysteinase	N/A			
C5IJA8	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1			
E7ECV8	ADP-ribose pyrophosphatase	NUDT9			
C5IWU3	ADP-ribosylation factor 3	ARF3			
C5IWT0	ADP-ribosylation factor 4	AEF4			
C5IWU1	ADP-ribosylation factor 6OS=Ovis	ARF6			
B3VHM9	Albumin	ALB			
W5PGC5	Aldose 1-epimerase	GALM			
W5PFB9	Alkaline phosphatase	ALPL			
Q28745	Alpha globin chain	N/A			
B6D983	Alpha-1-acid glycoprotein	AGP			
W5PMZ6	Alpha-mannosidase	LOC101117846			

W5NWN2	Alpha-mannosidase	MAN2C1			
W5PM86	Alpha-mannosidase	N/A			
W5NUW3	Amine oxidase	AOC3			
E5G6E9	Ammonia transporter RhCGOS	N/A			
Q4W1E4	Angiotensin-I converting enzyme	ace			
W5PSZ5	Annexin	ANXA1			
W5QEU6	Annexin	ANXA4			
W5PZM9	Annexin	ANXA5			
A2SW69	Annexin A2	ANXA2			
A5JSS5	As2-casein	N/A			
G1DG30	Aspartate aminotransferase	GOT1			
W5NUG0	Aspartate aminotransferase	GOT2			
W5PS88	Aspartateamino transferase	GOT1			
C5IWW2	Aspartyl-tRNA synthetase	DARS			
W5NY50	ATP synthase subunit alpha	ATP5A1			
W5PEP7	ATP synthase subunit beta	ATP5B			
W5PP30	ATPase ASNA1	ASNA1			
Q09GP3	ATP-binding cassette sub-family G member 2	ABCG 2			
Q2TCH3	ATP-citrate synthase	ACLY			
W5QDD4	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	PFKM			
W5P8B9	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	CLPP			
W8SWB6	Bactericidal permeability-increasing protein	N/A			
Q1KYZ9	Beta globin chain	HBB			
Q6QAT4	Beta-2-microglobulin	B2M			
Q865G0	Beta-actin	N/A			
W5Q1M0	Beta-galactosidase	GLB1			
W5P3N6	Beta-hexosaminidase	LOC101112162			
W5QC89	Beta-hexosaminidase	HEXA			
W5P3C6	Beta-hexosaminidase	HEXB			
Q95327	Beta-mannosidase	MANBA			
A1Z181	Bodhesin-2, Bodhesin-3, Bodhesin-4	Bdh-2, Bdh-3, Bdh-4			
A0A075W0S2	BPI fold containing family A member 1	BPIFA1			
S5LQM4	BPI fold containing family A member 1 protein	BPIFA1			
W5P925	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	PRKACA			
B6Z9S4	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit alpha 1	N/A			
W5PTU7	Carbonic anhydrase 2	CA2			
W5QB42	Carboxylic ester hydrolase	CES5A			

W5PAM4	Carboxypeptidase	CTSA			
W5PGN7	Carboxypeptidase	CPVL			
C6KGS5	Catalase	CAT			
P54230	Cathelicidin-1	CATHL1A			
W5Q0Z2	Cathepsin B	CTSB			
X2J1X8	Cathepsin D	CTSD			
A0A060IV93	Cathepsin F	N/A			
W5QGU9	Cation-transporting ATPase	ATP13A4			
M4WED3	Cell division cycle 42	CDC42			
D6QUQ1	Chloride anion exchanger	SLC26A3			
W5P8X9	Chloride intracellular channel protein	CLIC4			
W5P610	Chloride intracellular channel protein	CLIC1			
G1DFQ5	Chloride intracellular channel protein	CLIC1			
C5IWT4	Chromosome 21 open reading frame 33	C21orf33			
W5PI38	Citrate synthase	CS			
W5PUT6	Clathrin heavy chain	CLTC			
W5PZI1	Clusterin	LOC101113728			
W5Q9P7	Cofilin-1	CFL1			
F2X909	Collagen typeI alpha 2	N/A			
W5PH10	Copper-transporting ATPase 2	ATP7B			
P56283	C-type natriuretic peptide	NPPC			
K4P494	Cystatin C	CST3			
W5NTB3	Cystatin-B	CST6			
D6PX64	Cysteine-rich secretory protein 3	CRISP3			
W5PSK0	Deoxyribonuclease	DNASE1L3			
W5PMF2	Diacylglycerol kinase	DGKA			
W5PB39	Dihydrolipoyl dehydrogenase	DLD			
W5NZA0	Dipeptidase	DPEP3			
A0A075TCY1	Dipeptidylpeptidase 4	DPP4			
W5PY48	DNA topoisomerase 2	TOP2A			
G1DGE3	Dynein light chain 2	DYNLL2			
Q717R8	Elongation factor 1-delta	EEF1D			
W5Q3R0	Elongationfactor 1-alpha	N/A			
B2LYK8	Endoplasmic reticulum protein 29	ERP29			
Q30DU1	Epidermal growth factor receptor	EGFR			
W5QHX1	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A2			
W5PRH3	Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6			
Q30B88	Fatty acid binding protein 5	N/A			
Q06B57	Fatty acid synthase	FASN			
W5PY53	Ferritin	FTH1			

W5PVJ0	FerritinOS	N/A			
W5Q5H8	Fibrinogen alpha chain	FGA			
C8BKC8	Four and a half LIM domains 1	FHL1			
W5PFR8	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1			
W5P1X9	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA			
C5IWW1	Fumarate hydratase	FH			
W5PHB8	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	GALT			
W5Q0A8	Glucosamine-6-phosphate isomerase	GNPDA2			
W5NUG3	Glucosamine-6-phosphate isomerase	GNPDA1			
W5P323	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI			
W5QBP6	Glutamine synthetase	GLUL			
C8BKD8	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	QPCT			
W5Q8B1	Glutathione peroxidase	N/A			
H9TN93	Glutathione peroxidase	GPx5			
W5QDF4	Glutathione S-transferase	GSTM3			
Q28554	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH			
W5PVD4	GTP:AMP phosphotransferase AK3,mitochondrial	AK3			
I6ZQG6	Guanine nucleotide binding protein alpha activating activity polypeptide O	GNAO1			
A4F2F7	Guanine nucleotide binding protein alpha inhibiting 2	Gi2			
J9QGI9	Heat shock 70kDa protein 1A	hspA1A			
M4NBE4	Heat shock 70kDa protein 5	HSPA5			
I6ZQY0	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8			
J7F274	Heat shock protein 70kDa protein 6	hspa6			
A8DR93	Heat shock protein alpha	HSPCA			
W5P659	Hexokinase	HK1			
W5QFM1	Histone H2A	LOC101106292			
W5QFQ8	Histone H2B	HIST1H2BE			
W5QGB5	Histone H4	LOC105603795			
R9Y0L2	Hormone-sensitive lipase	HSL			
D0F094	Hormone-sensitive lipase	LIPE			
I3WAE6	HSP27 protein	HSP27			
W5NSU1	Hyaluronidase	LOC101107188			
Q8SQG7	Hyaluronidase-2	HYAL2			
B6UV59	Hydroxy acyl-coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-coenzyme A thiolase/enoyl-coenzyme A hydratase (Trifunctional protein) alpha subunit	HADHA			
F6M3U6	Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP-5			
W5PJ62	Integrin beta	ITGB4			

W5PR04	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	IDH2			
W5P958	Isocitrate dehydrogenase[NAD]subunit, mitochondrial	IDH3G			
W5P8N9	Isocitrate dehydrogenase[NAD]subunit, mitochondrial	IDH3B			
W5NR14	Isocitrate dehydrogenase[NAD]subunit, mitochondrial	IDH3A			
W5QCD6	Isocitrate dehydrogenase[NADP]	IDH1			
B3VSB9	ITM2B	ITM2B			
W5NZX4	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	KATNAL2			
B6ZCR1	Lactoferrin	lrf			
W5PRR5	Leukotriene A(4) hydrolase	LTA4H			
A0A059U2L1	Lipocalin	N/A			
A0A059U1E3	Lipocalin 8	LCN8			
W5PIF6	L-lactate dehydrogenase	LDHC			
W5PIN6	L-lactate dehydrogenase	LDHA			
W5NXL6	L-lactatedehydrogenaseOS=Ovaries	LDHAL6B			
Q1ZZU7	Macrophage migration inhibitory factor	MIF			
A7UAC5	Major prion protein	prp			
W5QFQ0	Malate dehydrogenase	MDH1			
C8CC56	Malic enzyme	ME1			
W5NY53	Mannose-6-phosphate isomerase	MPI			
Q9XSQ8	MAP28 protein	map28			
C8BKE4	Matrix metalloproteinase 2	MMP2			
C8BKC3	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2			
A4ZVX2	MHC class I antigen	ovar			
Q30820	MHC class I antigen	N/A			
G5CC03	Milk fat globule EGF factor 8 protein	MFG			
Q0PD85	Monocarboxylate transporter 1	SLC16A1			
W5PRP1	Na(+)/H(+)exchangeregulatorycofactor	NHE-RF			
B2LSM7	N-acetylgalactosaminidase alpha	N/A			
W5Q4D9	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	ART3			
W5P816	NAD(P)H-hydrate epimerase	NAXE			
W5QCI3	NADH-cytochrome b5 reductase	CYB5R3			
W5Q9L2	NADH-cytochrome b5 reductase	CYB5R1			
W5PAI8	Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase	NMNAT3			
Q30B76	Niemann-Pickdisease type C2	N/A			
W5Q595	NIF3-likeprotein 1	NIF3L1			
W5NYH2	Nucleoside diphosphate kinase	N/A			

A1YZ35	Osteoglycin	OGN			
W5PD71	Pentaxin	CRP			
W5QHU9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PIIB			
W5QB61	Peptidylprolyl isomerase	N/A			
W5Q3X2	Peptidylprolyl isomerase	N/A			
M4T8F1	Peroxiredoxin 6	Prdx6			
L0CSP6	Peroxiredoxin-5	PRDX5			
B7TJ13	Phosphoglycerate kinase	PGK1			
W5PG09	Phosphoglycerate kinase	PGK2			
W5PVY5	Phosphoglycerate mutase	PGAM2			
W5PT19	Phospholipid-transporting ATPase	ATP8B3			
W5PTI5	Phospholipid-transporting ATPase	LOC101115135			
W5PKM1	Phospholipid-transporting ATPase	ATP11C			
E3VXD0	Plasma membrane calcium ATPase	ATP2B			
P81286	Plasminogen	PLG			
W5PJ21	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT10			
W5NTE9	Presenilin	PSEN2			
Q9XSM0	Prostaglandin-H2D-isomerase	PTGDS			
W5PVU5	Proteasome subunit alpha type	PSMB7			
W5QE19	Proteasome subunit alpha type	PSMB2			
W5P500	Proteasome subunit alpha type	PSMB1			
W5NS93	Proteasome subunit alpha type	PSMA4			
K4P231	Proteasome subunit alpha type	PSMA2			
W5PJC2	Proteasome subunit alpha type	PSMB3			
W5QIL2	Proteasome subunit alpha type	PSMB4			
W5P9U4	Proteasome subunit alpha type	PSMA1			
W5QDM2	Proteasome subunit alpha type	PSMB5			
W5QIY3	Proteasome subunit alpha type	PSMA3			
W5PC09	Proteasome subunit alpha type	PSMA6			
W5QD30	Proteasome subunit alpha type	PSM5			
W5PB07	Proteasome subunit alpha type	PSMA8			
W5QC35	Protein disulfide-isomerase	PDIA4			
W5PMM7	Protein disulfide-isomerase	PDIA3			
W5Q9H2	Protein disulfide-isomerase	P4HB			
W5PIE3	Protein phosphatase methylesterase 1	PPME1			
W5NRC1	Protein S100	S100A16			
W5NY22	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PCMT1			
W5P1A8	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	RET			
Q7M2L1	Pyridoxal kinase	N/A			
W5QC41	Pyruvate kinase	PKM			

W5P3E8	Rab GDP dissociation inhibitor	GDI1			
A9LM10	RAB1A	N/A			
I1VE57	Ras-like protein family member A	RHOA			
I1W1N4	Ras-related protein Rab-11B	RAB11B			
I1W1N0	Ras-related protein Rab-2A	RAB2A			
A5JSV6	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1			
G1DG94	Receptor expression-enhancing protein	REEP3			
W5PWC5	Receptor protein-tyrosine kinase	EGFR			
W5PL06	Regulator of telomere elongation helicase 1	RTEL1			
P67927	Ribonuclease pancreatic	RNASE1			
W5P1T4	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP4C			
W5PWN6	Serine/threonine-protein phosphatase	CDKL3			
W5PWZ7	Serine/threonine-protein phosphatase	PPEF1			
W5PKT3	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP3CC			
W5Q7U7	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP1CC			
W5PG83	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PTPA			
G1DGI1	Serpine 2 protein	SERPINE2			
W5QG59	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	ATP1A1			
W5PEY3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	ATP1A4			
W5P945	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta	ATP1B3			
P47843	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	SLC2A3			
Q8WMN1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	SLC2A5			
V9I0K9	Solute carrier family 5 member 1	SLC5A1			
P07846	Sorbitol dehydrogenase	SORD			
W5QIT0	Sorbitol dehydrogenase	SORD			
C6ZEA8	Sperm-egg fusion1	Izumo 1			
A5JV04	Stabilin-1 interacting chitinase-like protein	N/A			
W5PLK2	Stathmin	STMN3			
W5Q216	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA			
W5PEA4	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	SUCLA2			
W5PL67	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	SUCLG2			
W5PGM1	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	OXCT1			
W5QFX2	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	N/A			
W5Q9K1	Sulfhydryl oxidase	QSOX1			

W5P340	Superoxide dismutase	SOD2			
Q5FB29	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1			
W5PQ18	Synaptogyrin	SYNGR4			
W5QH64	Synaptosomal-associated protein	SNAP23			
W5P765	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3			
W5P375	T-complex protein1 subunit alpha	TCP1			
W5PHP4	T-complex protein1 subunit delta	LOC105608622			
W5PSZ6	Testis anion transporter 1	SLC26A8			
W5NUN7	Tetraspanin	CD82			
W5PYR6	Tetraspanin	TSPAN8			
W5NYZ6	Tetraspanin	CD81			
B2LU28	TPM1	N/A			
H9TKZ8	Transaldolase	TALDO			
W5Q743	Transporter	LOC101119236			
P12303	Transthyretin	TTR			
W5Q6H9	Triacylglycerol lipase	PNLIPRP2			
W5P5W9	Triosephosphate isomerase	TPI1			
W5P669	Tubulin beta chain	TUBB4A			
W5PIL6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	UCHL5			
W5Q922	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	LOC101105383			
W5P223	Ubiquitin thioesterase	OTUB1			
Q6Q292	Ubq-S27a protein	N/A			
M4WXC2	Vanin 2	VNN2			
A2P2G9	VH region	VH			
Q3LRQ1	Vitronectin	N/A			

ANEXO C – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2	P3
W5P303	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB			
W5QBD7	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ			
W5NRT6	Acetyl-CoA carboxylase 1	ACACA			
W5P9I9	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACSS1			
W5QAA9	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2			

W5QFL6	Acrosin	ACR			
W5PHX1	Adenosylhomocysteinase	AHCY			
W5QI77	Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2			
W5PGC5	Aldose 1-epimerase	GALM			
W5PFB9	Alkaline phosphatase	ALPL			
W5QHZ1	Alkaline phosphatase	LOC101109677			
W5PM86	Alpha-mannosidase	N/A			
W5PMZ6	Alpha-mannosidase	LOC101117846			
W5QC34	Alpha-mannosidase	MAN2A1			
W5PLN7	Alpha-mannosidase	N/A			
W5PS45	Alpha-mannosidase (Fragment)	MAN2B1			
W5Q0C6	Amyloid beta A4 protein	APP			
W5PCN2	Annexin	ANXA7			
W5PZM9	Annexin	ANXA5			
W5PSZ5	Annexin	ANXA1			
W5QBJ0	Annexin	ANXA3			
W5P1Q0	AP complex subunit beta	AP1B1			
W5P8Q0	AP complex subunit beta	AP2B1			
W5PS88	Aspartate aminotransferase	GOT1			
W5PEP7	ATP synthase subunit beta	ATP5B			
W5QDD4	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	PFKM			
W5Q1M0	Beta-galactosidase	GLB1			
W5P3C6	Beta-hexosaminidase	HEXB			
W5QC89	Beta-hexosaminidase	HEXA			
W5Q292	Calcium-transporting ATPase	ATP2B1			
W5PTU7	Carbonic anhydrase 2	CA2			
W5QB42	Carboxylic ester hydrolase	CES5A			
W5PAM4	Carboxypeptidase	CTSA			
W5QB36	Catalase	CAT			
W5Q0Z2	Cathepsin B	CTSB			
W5QGU9	Cation-transporting ATPase	ATP13A4			
W5PAD4	Chloride anion exchanger	SLC26A3			
W5P8X9	Chloride intracellular channel protein	CLIC4			
W5P610	Chloride intracellular channel protein	CLIC1			
W5PI38	Citrate synthase	CS			
W5PZI1	Clusterin	LOC101113728			
W5Q9U3	C-type natriuretic peptide	CNP			
W5PD15	Elongation factor 1-alpha	LOC101120236			
W5QHX1	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A2			

W5PRH3	Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6			
W5PA59	Ferritin	LOC101117015			
W5Q5H8	Fibrinogen alpha chain	FGA			
W5PFR8	Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP1			
W5P1X9	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA			
W5PHB8	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	GALT			
W5Q0A8	Glucosamine-6-phosphate isomerase	GNPDA2			
W5P323	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI			
W5P1A5	Glucosylceramidase	GBA			
W5QBP6	Glutamine synthetase	GLUL			
W5Q8B1	Glutathione peroxidase	GPX6			
W5Q824	Glutathione S-transferase	GSTA1			
W5PVD4	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	AK3			
W5PP04	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	GNG12			
W5P659	Hexokinase	HK1			
W5PUU8	Histone H2A	HIST2H2AC			
W5QGB5	Histone H4	LOC105603795			
W5QCD6	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	IDH1			
W5NZX3	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	KATNAL2			
W5Q0T3	Lactoylglutathione lyase	GLO1			
W5PRR5	Leukotriene A(4) hydrolase	LTA4H			
W5QGD1	L-lactate dehydrogenase	LDHB			
W5PIF6	L-lactate dehydrogenase	LDHC			
W5PIN6	L-lactate dehydrogenase	LDHA			
W5QFQ0	Malate dehydrogenase	MDH1			
W5PC82	Malic enzyme	ME1			
W5PRP1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF	SLC9A3R1			
W5QB71	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	AMDHD2			
W5Q4D9	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	ART3			
W5Q595	NIF3-like protein 1	NIF3L1			
W5Q4H9	Nucleoside diphosphate kinase	NME3			
W5PD71	Pentaxin	CRP			
W5QB61	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	FKBP1A			
W5Q3X2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	N/A			
W5QHU9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIB			

W5PG09	Phosphoglycerate kinase	PGK2			
W5QBV3	Phosphoglycerate kinase	PGK1			
W5Q2D6	Phosphoinositide phospholipase C	PLCL1			
W5QH40	Phosphoinositide phospholipase C	PLCZ1			
W5PTI5	Phospholipid-transporting ATPase	LOC101115135			
W5PT19	Phospholipid-transporting ATPase	ATP8B3			
W5PKM1	Phospholipid-transporting ATPase	ATP11C			
W5PS11	Phosphoserine aminotransferase	PSAT1			
W5PJ21	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT10			
W5PDL7	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT5			
W5PN17	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT12			
W5Q7C7	Proteasome subunit alpha type	PSMA2			
W5P9U4	Proteasome subunit alpha type	PSMA1			
W5PB07	Proteasome subunit alpha type	PSMA8			
W5PC09	Proteasome subunit alpha type	PSMA6			
W5QIY3	Proteasome subunit alpha type	PSMA3			
W5QD30	Proteasome subunit alpha type	PSMA5			
W5QDM2	Proteasome subunit beta type	PSMB5			
W5QE19	Proteasome subunit beta type	PSMB2			
W5P500	Proteasome subunit beta type	PSMB1			
W5PJC2	Proteasome subunit beta type	PSMB3			
W5PVU5	Proteasome subunit beta type	PSMB7			
W5QIL2	Proteasome subunit beta type	PSMB4			
W5QDN6	Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5			
W5Q9H2	Protein disulfide-isomerase	P4HB			
W5PMM7	Protein disulfide-isomerase	PDIA3			
W5QC35	Protein disulfide-isomerase	PDIA4			
W5QIV1	Protein S100	S100A11			
W5PX03	Protein XRP2	RP2			
W5PVQ2	Protein-tyrosine-phosphatase	PTPRK			
W5QC41	Pyruvate kinase	PKM			
W5PR68	Receptor expression-enhancing protein	REEP6			
W5PKE6	S-adenosylmethionine synthase	MAT1A			
W5QH42	S-adenosylmethionine synthase	MAT2A			
W5P1T4	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP4C			

W5PWZ7	Serine/threonine-protein phosphatase	PPEF1			
W5PKT3	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP3CC			
W5Q7U7	Serine/threonine-protein phosphatase	N/A			
W5PG83	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PPP2R4			
W5PEY3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	ATP1A4			
W5P945	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta	ATP1B3			
W5QGQ1	Solute carrier organic anion transporter family member	SLCO1A2			
W5QIT0	Sorbitol dehydrogenase	SORD			
W5PLM3	Sperm surface protein Sp17	SPA17			
W5PLK2	Stathmin	STMN3			
W5QFN4	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	LOC101120376			
W5Q9K1	Sulfhydryl oxidase	QSOX1			
W5P340	Superoxide dismutase	SOD2			
W5PQ18	Synaptogyrin	SYNGR4			
W5QH64	Synaptosomal-associated protein	SNAP23			
W5P375	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1			
W5QFZ3	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4			
W5P765	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3			
W5PFL8	Tetraspanin	CD9			
W5PYR6	Tetraspanin	TSPAN8			
W5P7X3	Transaldolase	TALDO1			
W5Q743	Transporter	LOC101119236			
W5P5W9	Triosephosphate isomerase	TPI1			
W5PZG6	Tyrosine-protein kinase	LYN			
W5PGD2	Tyrosine-protein kinase receptor	ROS1			
W5Q922	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	LOC101105383			
W5P621	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP7			
W5PIL6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	UCHL5			
W5NZZ3	V-type proton ATPase subunit F	ATP6V1F			

ANEXO D – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE COELHOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2	P3
P83468	14 kDa phosphohistidine phosphatase	PHPT1			
G1SZD6	14-3-3 protein theta	YWHAQ			
G1U723	3alpha/17beta/20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	PGER5			
G1U1X6	5-nucleotidase	NT5C3A			
G1T7Z0	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD			
P50757	72 kDa type IV collagenase	MMP2			
P48038	Acrosin	ACR			
P68135	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1			
P29751	Actin, cytoplasmic 1	ACTB			
G1T277	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3			
G1SMY7	Acylamino-acid-releasing enzyme	APEH			
Q8WN94	Acyl-CoA-binding protein	DBI			
G1SYS6	Acylphosphatase	ACYP1			
P00820	Acylphosphatase-2	ACYP2			
G1SVH0	Adenosylhomocysteinase	AHCY			
G1T432	Adenylyl cyclase-associated protein	CAP1			
O19053	Alcohol dehydrogenase class-3	ADH5			
P80456	Aldehyde oxidase 1	AOX1			
G1T6I0	Aldehyde oxidase 1	AOX1			
G1SQS1	Aldose 1-epimerase	GALM			
P15122	Aldose reductase	AKR1B1			
G1SLU6	Alkaline phosphatase	ALPL			
U3KMU3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	PYGM			
G1SIB9	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	PYGB			
P25227	Alpha-1-acid glycoprotein	ORM1			
Q28665	Alpha-1-antiproteinase E	LOC100008986			
P23035	Alpha-1-antiproteinase F	N/A			
G1SYM4	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG			
U3KMR2	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG			
Q45GR2	Alpha-2-plasmin inhibitor	SERPINF2			
G1SUF9	Alpha-mannosidase	N/A			

G1SJN5	Alpha-mannosidase	MAN2A1			
G1T8S8	Alpha-mannosidase	LOC100346772			
G1T590	Amino acid transporter	SLC1A6			
P15541	Aminopeptidase N	ANPEP			
Q95JD3	Ammonium transporter Rh type C	RHCG			
G1TYT4	Angiotensin-converting enzyme	ACE			
G1T3I9	Annexin	ANXA7			
G1SNT8	Annexin	ANXA6			
G1TIS5	Annexin	ANXA1			
G1TEM7	Annexin	ANXA3			
G1TA83	Annexin	ANXA4			
G1SL62	Annexin	ANXA2			
G1TED6	Annexin	ANXA5			
P51662	Annexin A1	ANXA1			
P33477	Annexin A11	ANXA11			
G1SL02	AP complex subunit beta	AP2B1			
P09809	Apolipoprotein A-I	APOA1			
B7NZM0	Apolipoprotein A-IV	APOA4			
G1TVU0	Aquaporin-2	AQP2			
G1T332	Aspartate aminotransferase	GOT1			
P12345	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2			
G1T4Z2	ATP-citrate synthase	ACLY			
G1T0H8	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	PFKP			
Q28740	Basigin	BSG			
P01885	Beta-2-microglobulin	B2M			
P25704	Beta-enolase	ENO3			
G1SL41	Beta-glucuronidase	GUSB			
G1SWR0	Beta-hexosaminidase	HEXA			
G1SK48	Bleomycin hydrolase	BLMH			
P62160	Calmodulin	CALM			
P06813	Calpain small subunit 1	CAPNS1			
G1SJ23	Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1			
P15253	Calreticulin	CALR			
Q6XLQ7	Calumenin	CALU			
P00919	Carbonic anhydrase 2	CA2			
G1SRL5	Carboxylic ester hydrolase	LOC100009551			
G1SRM0	Carboxylic ester hydrolase	CES5A			
G1SDZ0	Carboxypeptidase	CTSA			
G1T6W7	Catalase	CAT			
Q59I72	Catenin alpha-1	CTNNA1			

G1TA99	Cation-transporting ATPase	ATP13A4			
B6V9S9	Chaperonin-containing T-complex polypeptide beta subunit	CCT2			
G1TPL4	Chloride anion exchanger	SLC26A3			
G1SJ77	Chloride intracellular channel protein	CLIC4			
Q95MF9	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1			
Q9N2G5	Chloride intracellular channel protein 6	CLIC6			
Q9XSC5	Clusterin	CLU			
G1T7I4	Coatomer subunit alpha	COPA			
G1T4A5	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1			
G1STJ4	Complement C3 alpha chain	C3			
P48747	Complement component C9	C9			
P00567	Creatine kinase B-type	CKB			
P00563	Creatine kinase M-type	CKM			
O97862	Cystatin-C	CST3			
G1U6B2	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	ALAD			
G1T5D5	Dipeptidase	DPEP2			
Q28660	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2	ADAM2			
P63169	Dynein light chain 1, cytoplasmic	DYNLL1			
Q28685	Dystroglycan	DAG1			
P68105	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1			
Q71V39	Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2			
P34826	Elongation factor 1-beta	EEF1B			
P53787	Elongation factor 1-delta	EEF1D			
P29694	Elongation factor 1-gamma	EEF1G			
O18750	Endoplasmin	HSP90B1			
P29562	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1			
P41110	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1			
G1TC37	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A2			
P41975	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD3			
G1SKI1	Ezrin	EZR			
Q09YN4	F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAPZA2			
G1TRG9	Fatty acid synthase	FASN			
G1TKN1	Ferritin	LOC100358983			
G1T6Q8	Ferritin	FTH1			

G1THL2	Ferritin	FTL			
G1TWA7	Fibrinogen alpha chain	FGA			
G1T0W8	Fibrinogen beta chain	FGB			
G1U9R6	Fibronectin	FN1			
G1SE61	Filamin-B	FLNB			
P00637	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1			
Q9N0J6	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	FBP2			
G1T652	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOC			
P00883	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA			
P79226	Fructose-bisphosphate aldolase B	ALDOB			
G1TPZ1	Galectin	LGALS1			
P56201	GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein	H6PD			
B7NZQ6	GDP dissociation inhibitor 1	GDI1			
G1TCQ4	Glucosamine-6-phosphate isomerase	GNPDA1			
Q9N1E2	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI			
G1TAC4	Glutaredoxin-1	GLRX			
G1TCG8	Glutathione peroxidase	GPX5			
G1T2A7	Glutathione S-transferase	LOC100354186			
Q08863	Glutathione S-transferase alpha I	N/A			
P46409	Glutathione S-transferase Mu 1	N/A			
Q08862	Glutathione S-transferase Yc	N/A			
G1SH63	Glutathione synthetase	GSS			
G1TUD0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDHS			
G1TYG1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH			
G1TUD2	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	GNG12			
P19007	Haptoglobin	HP			
P30946	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1			
G1T8Q6	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1			
P01948	Hemoglobin subunit alpha-1/2	N/A			
P02057	Hemoglobin subunit beta-1/2	HBB1			
G1TVS4	Hemopexin	HPX			
O19049	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK			
G1SRI8	Hexokinase	HK1			
G1U754	Histidine-rich glycoprotein	HRG			
G1U155	Histone H2B	HIST1H2BH			
G1TN68	Histone H4	HIST1H4F			

G1T1B3	Hyaluronidase	SPAM1			
G1TFC9	Hydroxypyruvate isomerase	HYI			
A7X8X3	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	HPRT			
P01879	Ig alpha chain C region	N/A			
P01870	Ig gamma chain C region	N/A			
P01687	Ig kappa chain V region	N/A			
P01685	Ig kappa chain V region 4135	N/A			
P01697	Ig kappa chain V region AH80-5	N/A			
P01840	Ig kappa-b4 chain C region	N/A			
G1TKP3	Ig lambda chain C region	N/A			
P23108	Immunoglobulin J chain	JCHAIN			
G1SI20	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	IDH1			
G1SS43	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	KATNAL2			
G1U854	Kinesin-like protein	KIF3A			
G1T545	Lactoylglutathione lyase	BTBD9			
P14755	Lambda-crystallin	CRYL1			
G1SP54	Leukotriene A(4) hydrolase	LTA4H			
G1TIS1	L-lactate dehydrogenase	LDHC			
G1TYA7	L-lactate dehydrogenase	LDHB			
P13491	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA			
G1TEB7	Lysozyme D1	LOC100356058			
G1SQG5	Malate dehydrogenase	MDH1			
G1T013	Malic enzyme	ME1			
G1SUK4	Mannose-6-phosphate isomerase	MPI			
P20614	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1			
Q9TRZ7	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2			
B7NZZS0	Myeloid-associated differentiation marker	MYADM			
Q28619	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	SLC9A3R1			
G1SJK3	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	ART3			
G1U634	Nepriylsin	MME			
P08049	Nepriylsin	MME			
G1SZS0	NIF3-like protein 1	NIF3L1			
G1U8I5	Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP			
G1U9T4	Nucleoside diphosphate kinase	NME2			
G1U7U3	Nucleoside diphosphate kinase	NME1			
C0HJA6	Odorant-binding protein 2	N/A			
C0HJA9	Odorant-binding protein 3	N/A			
P31097	Osteopontin	SPP1			

G1TEJ7	Oxysterol-binding protein	OSBP2			
G1SV27	Oxysterol-binding protein	OSBPL1A			
G1SVZ2	P2X purinoceptor	P2RX7			
G1SFG2	Palmitoyltransferase	ZDHHC20			
Q02157	Pancreatic triacylglycerol lipase	PNLIP			
G1TXI0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	FKBP11			
Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA			
P62943	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A			
P27124	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	FKBP4			
Q8MK67	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1			
P48738	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	PITPNA			
P00949	Phosphoglucomutase-1	PGM1			
G1T7Z6	Phosphoglycerate kinase	LOC100348124			
G1SNJ9	Phosphoglycerate kinase	PGK2			
G1SZX7	Phosphoinositide phospholipase C	PLCB4			
Q05017	Phospholipase B1, membrane-associated	PLB1			
G1TQW3	Phospholipid-transporting ATPase	ATP11A			
P10658	Phosphoserine aminotransferase	PSAT1			
G1T8R1	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	RAP1GAP2			
O19048	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1			
G1TUR3	Polyadenylate-binding protein	LOC100340865			
P01832	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR			
G1T0K4	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT7			
G1SWQ5	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT5			
G1SLX4	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1	KCNQ1			
G1T7M0	Presenilin	PSEN1			
G1T670	Proteasome subunit alpha type	SORT1			
G1T9V4	Proteasome subunit alpha type	PSMA6			
G1T519	Proteasome subunit alpha type	PSMA4			
G1SWI7	Proteasome subunit alpha type	PSMA8			
G1T2L1	Proteasome subunit alpha type	PSMA2			
G1SGW4	Proteasome subunit beta type	PSMB9			
G1SU71	Proteasome subunit beta type	PSMB1			
G1SWK8	Proteasome subunit beta type	PSMB7			

G1T4X8	Proteasome subunit beta type	PSMB2			
G1T918	Proteasome subunit beta type	PSMB4			
G1T4Q9	Proteasome subunit beta type	PSMB5			
G1SHV9	Proteasome subunit beta type	PSMB3			
G1T235	Proteasome subunit beta type	PSMB6			
P21195	Protein disulfide-isomerase	P4HB			
G1SFV1	Protein disulfide-isomerase	PDIA4			
G1SEV2	Protein disulfide-isomerase	PDIA3			
G1SY23	Protein kinase C	PRKCQ			
P30801	Protein S100-A6	S100A6			
G1SJZ2	Protein tweety homolog	TTYH3			
P22758	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	TGM1			
G1SDF2	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PCMT1			
G1SJ43	Protein-tyrosine-phosphatase	PTPN23			
Q95MN6	Proteolipid protein 2	PLP2			
P11974	Pyruvate kinase PKM	PKM			
G1SNH7	Quinoid dihydropteridine reductase	QDPR			
P62493	Ras-related protein Rab-11A	RAB11A			
P46629	Ras-related protein Rab-25	RAB25			
Q01971	Ras-related protein Rab-2A	RAB2A			
G1SFU0	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A			
Q8MI17	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1			
G1TCS3	Ribulose-phosphate 3-epimerase	RPE			
G1T005	Serine/threonine-protein phosphatase	PPEF1			
G1SWW8	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP1CC			
G1TMD8	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP5C			
G1SX32	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP6C			
Q28717	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PPP2R4			
P19134	Serotransferrin	TF			
G1U9S2	Serum albumin	ALB			
G1SHU0	Sex hormone-binding globulin	SHBG			
P15196	Sex hormone-binding globulin	SHBG			
G1TM59	Small ubiquitin-related modifier	SUMO4			
G1TSW1	Small ubiquitin-related modifier	SUMO1			
P11170	Sodium/glucose cotransporter 1	SLC5A1			
Q9N0Z6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1			
G1SD34	Sodium/potassium-transporting	ATP1B3			

	ATPase subunit beta				
Q9XT77	Sodium-dependent multivitamin transporter	SLC5A6			
G1TI27	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	SLC2A3			
G1TCQ0	Solute carrier organic anion transporter family member	SLCO4C1			
Q95209	Sortilin-related receptor	SORL1			
G1SR41	Stathmin	STMN1			
G1T6A1	Sulfate transporter	SLC26A2			
G1SND0	Sulfhydryl oxidase	QSOX1			
P09212	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1			
P41982	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2			
G1T0E5	Synaptosomal-associated protein	SNAP23			
G1U9S7	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1			
G1U9T8	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4			
G1SCN8	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3			
O77622	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6			
G1SKR3	Tetraspanin	TEAD4			
G1U4L0	Tetraspanin	TSPAN16			
G1SE84	Tetraspanin	CD82			
G1TPC8	Tetraspanin	CD63			
G1SYM3	Tetraspanin	CD9			
P08628	Thioredoxin	TXN			
P34032	Thymosin beta-4	TMSB4			
G1TKE3	Transgelin	TAGLN2			
G1TAH7	Transketolase	TKT			
P43348	Translationally-controlled tumor protein	TPT1			
Q28735	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMED10			
P07489	Transthyretin	TTR			
P00939	Triosephosphate isomerase	TPI1			
Q95212	Tumor protein D52	TPD52			
B7NZM8	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptid	YWHAH			
G1SIY6	Tyrosine-protein kinase	LYN			
G1SPV2	Tyrosine-protein kinase	YES1			
P62975	Ubiquitin	N/A			
G1SRQ2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	UCHL3			

G1SMJ5	Ubiquitin-fold modifier 1	UFM1			
Q29504	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1			
G1T398	UMP-CMP kinase	CMPK1			
P02779	Uteroglobin	SCGB1A1			
P53789	Vitamin D-binding protein	GC			
P98118	Vitamin K-dependent protein S	PROS1			
G1U3Q0	V-type proton ATPase subunit a	ATP6V0A1			
G1SPA2	Zonadhesin	ZAN			

ANEXO E – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1 E P2) E COM AFINIDADE À GELATINA (P3) DO PLASMA SEMINAL DE EQUINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2	P3
F7D917	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD			
F6YG82	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5			
F7CZ92	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1			
P60708	Actin, cytoplasmic 1	ACTB			
F7CBN0	Alcohol dehydrogenase (NADP+)-like protein	AKR1A1			
F6W787	Annexin	ANXA6			
F6ZAK1	Annexin	ANXA3			
F7ALC9	Annexin	ANXA7			
F7CL15	Annexin	ANXA5			
F7DE06	Annexin	ANXA11			
F6ZI51	Annexin	ANXA2			
F6S9R7	ANXA4	Annexin			
Q70WU4	Aquaporin 5	aqp5			
F6XUJ2	ATP synthase subunit alpha	ATP5A1			
F6U187	ATP synthase subunit beta	ATP5B			
P80720	Carbohydrate-binding protein AWN	N/A			
F7C7A8	Carboxylic ester hydrolase	CES5A			
F7D854	Catalase	CAT			
F6ZHQ5	Chloride intracellular channel protein	CLIC1			
Q29482	Clusterin	CLU			

O19010	Cysteine-rich secretory protein 3	CRISP3			
F6VCE9	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	ALAD			
F6UME7	Elongation factor 1-alpha	LOC100050433			
F7CN11	Fibronectin	FN1			
F6SX98	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA			
F6ZE54	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI			
F6YV40	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	LOC100054877			
F7BGR9	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	GNG12			
F7E3C9	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	GNG5			
A2Q0Z1	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8			
Q9GKX7	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1			
F7BA85	Hexokinase	HK1			
F6W1T4	Histone H2A	LOC100063021			
F7E1X9	Histone H2B	HIST1H2BD			
F7C964	Histone H3	LOC100059700			
F6VVF9	Histone H4	HIST1H4C			
F6W9B1	Hsc70-interacting protein-like protein	ST13			
Q6H321	Kallikrein-1E2	KLK1E2			
O77811	Lactotransferrin	LTF			
F6YU15	Latherin	LATH			
C6L1J5	L-lactate dehydrogenase	LDHB			
Q95182	Major allergen Equ c 1	N/A			
Q8MIF7	Phosphoglycerate kinase 2	PGK2			
F6YYP6	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS			
F7ANR3	Proteasome subunit alpha type	PSMA3			
F6RM82	Protein S100	S100A9			
F6T046	Protein S100	N/A			
F6XLG0	Purine nucleoside phosphorylase	N/A			
F7AWD2	Ras-related protein Rab-2B-like protein	RAB2B			
F6SSK7	Ras-related protein Rap-1b-like protein	RAP1B			
F7CKH3	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1			
Q70GG6	Seminal plasma protein 1	sp-1			
P27425	Serotransferrin	TF			
P35747	Serum albumin	ALB			
Q6SJP3	Solute carrier family 16 member 1	SLC16A1			
F6WQ44	Sulfhydryl oxidase	QSOX1			
F6RFA6	Synaptogyrin	SYNGR4			
H9H043	Tetraspanin	TSPAN8			

F6WQJ4	Tetraspanin	CD9		
F6TZS9	Triosephosphate isomerase	TPI1		

ANEXO F – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À GELATINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE SUÍNOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2
F1RS36	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5		
P08001	Acrosin	ACR		
Q29016	Acrosin-binding protein	ACRBP		
I3LB86	Alkaline phosphatase	ALPL		
P29700	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG		
F1SEY1	Alpha-mannosidase	LOC100518647		
F1SJB5	Annexin	ANXA1		
F2Z5C1	Annexin	ANXA5		
P19620	Annexin A2	ANXA2		
Q07717	Beta-2-microglobulin	B2M		
F1SI88	Beta-hexosaminidase	HEXA		
D0G6X8	Beta-hexosaminidase	HEXB		
O02826	Beta-microseminoprotein	MSMB		
A5PF01	B-factor, properdin	BF		
K7GRG6	BPI fold-containing family A member 1	BPIFA1		
P24020	Carbohydrate-binding protein AQN-3	AQN-3		
P26776	Carbohydrate-binding protein AWN	N/A		
F1SC70	Carboxypeptidase	CTSA		
A1E295	Cathepsin B	CTSB		
Q28944	Cathepsin L1	CTSL		
Q29549	Clusterin	CLU		
P01025	Complement C3	C3		
Q5XLD3	Creatine kinase M-type	CKM		
Q6QAQ1	ctin, cytoplasmic 1	ACTB		
P18104	C-type natriuretic peptide	NPPC		
O18994	Epididymal secretory glutathione peroxidase	GPX5		
O97763	Epididymal secretory protein E1	NPC2		
F1RX37	Fibrinogen beta chain	FGB		

P20735	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	GGT1		
Q8SPS7	Haptoglobin	HP		
O02705	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1		
P50828	Hemopexin	HPX		
P01846	Ig lambda chain C region	N/A		
Q29545	Inhibitor of carbonic anhydrase	ICA		
I3LTC6	Inositol monophosphatase 1	IMPA1		
F1SH92	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4		
P79263	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4		
P79385	Lactadherin	MFGE8		
Q6YT39	Lactotransferrin	LTF		
P35495	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	PSP-I		
P35496	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	PSP-II		
C4TP28	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4	pebp4		
Q6RI85	Phosphoglycerate kinase 2	PGK2		
B5KJG2	Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2		
O46427	Pro-cathepsin H	CTSH		
P32195	Protegrin-2	NPG2		
C3S7K5	Protein S100	S100A8		
P80310	Protein S100-A12	S100A12		
F1SU97	Saposin-B-Val	PSAP		
F1RUN2	Serum albumin	ALB		
Q4R0H3	Spermadhesin AQN-1	AQN-1		
P04178	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1		
C0JPM4	Tissue inhibitor of metalloproteases-2	TIMP-2		
F1RHF0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	UCHL3		
P63053	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52		

ANEXO G – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE BOVINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2
P61603	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1		
G3N2D7	12 kDa protein	IGLL1		
F1N076	121 kDa protein	CP		
P68250	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB		

P62261	14-3-3 protein epsilon	YWHAE		
P68252	14-3-3 protein gamma	YWHAG		
Q0VC36	14-3-3 protein sigma	SFN		
Q3SZI4	14-3-3 protein theta	YWHAQ		
P63103	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ		
A8YXY3	15 kDa selenoprotein	SEP15		
Q1RML2	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase zeta-1	PLCZ1		
Q2KI42	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	PSMD11		
G8JKV6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13		
P56701	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	PSMD2		
Q2KJ46	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3		
Q3ZBD0	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	PSMD7		
Q3SYT7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	PSMD8		
Q3ZCK3	3(2),5-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1		
Q2HJD7	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	HIBADH		
Q3T0F4	40S ribosomal protein S10	RPS10		
Q3ZBH8	40S ribosomal protein S20	RPS20		
P26452	40S ribosomal protein SA	RPSA		
Q3ZBZ1	45 kDa calcium-binding protein	SDF4		
Q2KJH9	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	ALDH9A1		
G3MZC1	5-nucleotidase	NT5E		
Q05927	5-nucleotidase	NT5E		
P31081	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1		
Q56K14	60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1		
Q3ZCI4	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD		
Q9GLE5	72 kDa type IV collagenase	MMP2		
Q0VCX2	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5		
F1MQX0	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACSS1		
Q17QB3	Acid ceramidase	ASAH1		
Q3ZC91	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	SMPDL3A		
Q95M17	Acidic mammalian chitinase	CHIA		
P20004	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2		
Q2TBH3	Actin related protein M1	ARPM1		
Q3ZC07	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1		

P63258	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1		
F1MRG7	Actin-related protein 2	ACTR2		
Q3MHR7	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2		
Q148J6	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4		
F1N049	Actin-related protein 3	ACTR3		
Q0IIC1	Acyl-CoA synthetase bubblegum family member 2	ACSBG2		
P07107	Acyl-CoA-binding protein	DBI		
Q3MHR0	Acyl-protein thioesterase 1	LYPLA1		
P56658	Adenosine deaminase	ADA		
Q3MHL4	Adenosylhomocysteinase	AHCY		
P08166	Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2		
P00570	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1		
F1MHP6	Adenylosuccinate lyase	ADSL		
A6QLB7	Adenylyl cyclase-associated protein	CAP1		
Q3T0E5	Adipocyte plasma membrane-associated protein	APMAP		
Q3Y5Z3	Adiponectin	ADIPOQ		
O62827	ADM	ADM		
A2VE47	ADP-dependent glucokinase	ADPGK		
Q3SZF2	ADP-ribosylation factor 4	ARF4		
Q3ZCJ2	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	AKR1A1		
Q3ZC42	Alcohol dehydrogenase class-3	ADH5		
P20000	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2		
Q5E962	Aldo-keto reductase family 1, member B1	AKR1B1		
Q5EA79	Aldose 1-epimerase	GALM		
P09487	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	ALPL		
A7YY28	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B	ABHD14B		
Q5GN72	Alpha-1-acid glycoprotein	agp		
P34955	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1		
Q2KJF1	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG		
P28800	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2		
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG		
Q7SIH1	Alpha-2-macroglobulin	A2M		
A5D7D1	Alpha-actinin-4	ACTN4		
Q9XSJ4	Alpha-enolase	ENO1		
G5E5M8	Alpha-mannosidase	LOC532207		
F1MWT0	Alpha-mannosidase	MAN2C1		

E1BHP0	Alpha-mannosidase	MAN2B2		
Q58DH9	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	NAGA		
P02662	Alpha-S1-casein	CSN1S1		
P02663	Alpha-S2-casein	CSN1S2		
P81125	Alpha-soluble NSF attachment protein	NAPA		
Q08E54	Amyloid beta (A4) protein	APP		
Q5EAC7	Anamorsin	CIAPIN1		
Q2NKV1	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	ANG		
P80929	Angiogenin-2	ANG2		
F1MQJ0	Angiotensin-converting enzyme	ACE		
Q3SZH5	Angiotensinogen	AGT		
P46193	Annexin A1	ANXA1		
P04272	Annexin A2	ANXA2		
Q3SWX7	Annexin A3	ANXA3		
P13214	Annexin A4	ANXA4		
P81287	Annexin A5	ANXA5		
P41361	Antithrombin-III	SERPINC1		
Q2KJ81	AP-1 complex subunit mu-1	AP1M1		
V6F9A2	Apolipoprotein A-I	APOA1		
P81644	Apolipoprotein A-II	APOA2		
Q32PJ2	Apolipoprotein A-IV	APOA4		
V6F9A3	Apolipoprotein C-III	ApoC3		
Q03247	Apolipoprotein E	APOE		
Q0P5B0	Arrestin domain containing 1	ARRDC1		
A6QLZ3	ARSB protein	ARSB		
Q08DD1	Arylsulfatase A	ARSA		
Q148F3	Arylsulfatase K	ARSK		
P33097	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1		
P12344	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2		
Q2HJH1	Aspartyl aminopeptidase	DNPEP		
A5PJD6	ATL3 protein	ATL3		
F1MLB8	ATP synthase subunit alpha	ATP5A1		
P00829	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B		
Q2KJ66	ATPase, H+ transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D	ATP6V1D		
Q4GZT4	ATP-binding cassette sub-family G member 2	ABCG2		
E1BCR1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	ABCA3		
Q32PF	ATP-citrate synthase	2ACLY		

E1BNQ4	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	CARKD		
E1BCW3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	PFKP		
F1MQ17	Bactericidal permeability-increasing protein	BPI		
Q9MZ08	Basal cell adhesion molecule	BCAM		
Q3ZBX0	Basigin	BSG		
Q3SZB0	Beta-1,3-glucuronyltransferase 3 (Glucuronosyltransferase I)	B3GAT3		
P08037	Beta-1,4-galactosyltransferase 1	B4GALT1		
Q5EA01	Beta-1,4-glucuronyltransferase 1	B4GAT1		
P01888	Beta-2-microglobulin	B2M		
F1MUF4	Beta-galactosidase	GLB1		
Q58D55	Beta-galactosidase	GLB1		
A3KMY8	Beta-glucuronidase	GUSB		
E1B9E8	Beta-hexosaminidase	N/A		
H7BWW2	Beta-hexosaminidase	HEXB		
Q0V8R6	Beta-hexosaminidase subunit alpha	HEXA		
Q5I597	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	BHMT		
A6QLB0	Beta-mannosidase	MANBA		
P13600	Beta-nerve growth factor	NGF		
P30122	Bile salt-activated lipase	CEL		
F1MJM4	Biotinidase	BTD		
Q2KJH1	Bone morphogenetic protein 4	BMP4		
Q8SPU5	BPI fold-containing family A member 1	BPIFA1		
F1MLW2	BPI fold-containing family B member 1	BPIFB1		
A6H758	C11H9ORF9 protein	C11H9ORF9		
Q3SX46	C1GALT1-specific chaperone 1	C1GALT1C1		
A5PJL8	C1QTNF5 protein	C1QTNF5		
F1N619	Cadherin-1	CDH1		
P62157	Calmodulin	CALM		
P13135	Calpain small subunit 1	CAPNS1		
Q27970	Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1		
P52193	Calreticulin	CALR		
P06833	Caltrin	PYY2		
Q3T0K1	Calumenin	CALU		
P00517	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	PRKACA		
P00514	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	PRKAR1A		
P00515	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	PRKAR2A		

A7Z066	Canx protein	canx		
P00921	Carbonic anhydrase 2	CA2		
E1BN79	Carboxylic ester hydrolase	CES5A		
Q17QK3	Carboxypeptidase Q	CPQ		
Q08DN5	Carnitine acetyltransferase	MGC142781		
P22226	Cathelicidin-1	CATHL1		
P19660	Cathelicidin-2	CATHL2		
P19661	Cathelicidin-3	CATHL3		
P33046	Cathelicidin-4	CATHL4		
P54229	Cathelicidin-5	CATHL5		
P56425	Cathelicidin-7	CATHL7		
P07688	Cathepsin B	CTSB		
F1MMR6	Cathepsin D	CTSD		
Q0VCU3	Cathepsin F	CTSF		
Q5E998	Cathepsin L2	CTSV		
P25326	Cathepsin S	CTSS		
P05689	Cathepsin Z	CTSZ		
P28291	C-C motif chemokine 2	CCL2		
A5PKA3	CCDC80 protein	CCDC80		
F1MHN8	CD166 antigen	ALCAM		
Q29423	CD44 antigen	CD44		
A7Z061	Cell division cycle protein 27 homolog	CDC27		
Q1ZYR0	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5	CLN5		
Q5EAB4	Chitinase domain-containing protein 1	CHID1		
P30922	Chitinase-3-like protein 1	CHI3L1		
Q5E9B7	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1		
A6QLI4	CHODL protein	CHODL		
P32749	Cholinesterase	BCHE		
Q6B857	Cilia- and flagella-associated protein 20	CFAP20		
Q29RK1	Citrate synthase, mitochondrial	CS		
P49951	Clathrin heavy chain 1	CLTC		
F1MWI1	Clusterin	N/A		
P17697	Clusterin	CLU		
Q2TBP7	C-Myc-binding protein	MYCBP		
Q2HJ57	Coactosin-like protein	COTL1		
Q28107	Coagulation factor V	F5		
P98140	Coagulation factor XII	F12		
Q5E9F7	Cofilin-1	CFL1		
A4FU11	Coiled-coil domain-containing	CCDC58		

	protein 58			
Q0PH99	Common salivary protein BSP30 form C	BSP30C		
Q3SYW2	Complement C2	C2		
Q2UVX4	Complement C3	C3		
F1MY85	Complement C5a anaphylatoxin	C5		
Q3MHN2	Complement component C9	C9		
P81187	Complement factor B	CFB		
Q3T0A3	Complement factor D	CFD		
Q28085	Complement factor H	CFH		
Q28106	Contactin-1	CNTN1		
Q92176	Coronin-1A	CORO1A		
A5PJY9	CPNE3 protein	CPNE3		
A7MB90	CSNK1G2 protein	CSNK1G2		
P55206	C-type natriuretic peptide	NPPC		
A7MBJ5	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	CAND1		
B8Y9T0	Cumulus cell-specific fibronectin 1 transcript variant	FN1		
Q29RH0	Cystatin-9	CST-9		
P25417	Cystatin-B	CSTB		
F6QEL0	Cystatin-B	CST6		
P01035	Cystatin-C	CST3		
P62894	Cytochrome c	CYCS		
Q3SZT9	Cytochrome c 2	CYCT		
G3N0I4	Cytosol aminopeptidase	LAP3		
Q3ZC84	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2		
O46411	Cytosolic purine 5-nucleotidase	NT5C2		
Q45VK8	DAF-2	CD55		
Q3ZBV9	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11	DHRS11		
F1MW13	Deoxyribonuclease-1-like 1	DNASE1L1		
P56541	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNASE2		
P33545	Desmocollin-2	DSC2		
F1N206	Dihydrolipoyl dehydrogenase	DLD		
P11179	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	DLST		
Q3ZCJ8	Dipeptidyl peptidase 1	CTSC		
P81425	Dipeptidyl peptidase 4	DPP4		
Q10741	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10		
A1A4K3	DNA damage-binding protein 1	DDB1		
Q27968	DnaJ homolog subfamily C	DNAJC3		

	member 3			
Q3SZI6	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	RPN2		
Q0P5A1	Dynactin subunit 3	DCTN3		
E1B7E2	Dynein light chain 2, cytoplasmic	DOCK3		
Q3MHR3	Dynein light chain 2, cytoplasmic	DYNLL2		
O18738	Dystroglycan	DAG1		
A5PJT7	ECM1 protein	ECM1		
A1A4K5	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	ENPP2		
P15396	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	ENPP3		
A5D7A0	EF-hand domain-containing protein D2	EFHD2		
F1N6N3	EH domain-containing protein 1	EHD1		
A6QPP7	ELA2 protein	ELA2		
P68103	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1		
Q3SZV3	Elongation factor 1-gamma	EEF1G		
Q3SYU2	Elongation factor 2	EEF2		
A6QPT7	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	ERAP2		
Q3T0L2	Endoplasmic reticulum resident protein 44	ERP44		
Q95M18	Endoplasmic reticulum chaperonin 60	HSP90B1		
Q3SZC0	Enhancer of rudimentary homolog	ERH		
Q3ZC64	Ephrin-A1	EFNA1		
A1L570	Ephrin-B1	EFNB1		
P79345	Epididymal secretory protein E1	NPC2		
P54281	Epithelial chloride channel protein	N/A		
A5PJN2	ERO1-like protein alpha	ERO1A		
Q3T0U3	Es1 protein	ES1		
Q3SZ54	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1		
P31976	Ezrin	EZR		
P79136	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB		
P50448	Factor XIIa inhibitor	N/A		
F1N647	Fatty acid synthase	FASN		
P55052	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5		
A8DC37	Fc-gamma-RII-D	FCGR2C		
O46415	Ferritin light chain	FTL		
Q58D62	Fetuin-B	FETUB		
P02672	Fibrinogen alpha chain	FGA		

P02676	Fibrinogen beta chain	FGB		
F1MGU7	Fibrinogen gamma-B chain	FGG		
F1MNW2	Fibroblast growth factor receptor	FGFR2		
Q5EA62	Fibulin-5	FBLN5		
P02702	Folate receptor alpha	FOLR1		
Q58D84	Follistatin-related protein 1	FSTL1		
Q3T173	Four and a half LIM domains 1	FHL1		
Q3SZB7	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1		
A6QLL8	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA		
Q148D3	Fumarate hydratase	FH		
Q2KIB0	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	FAHD2		
Q28193	Furin	FURIN		
G1K1R6	Galactokinase	GALK1		
A6QLZ0	Galectin	LGALS3		
A7E3W2	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP		
A7YWG4	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH		
F1MAU3	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	IFI30		
Q863C3	Gastrin-releasing peptide	GRP		
Q3SX14	Gelsolin	GSN		
Q32LB5	GLIPR1-like protein 1	GLIPR1L1		
Q3ZBD7	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI		
Q28034	Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH		
Q2KHZ8	Glucosylceramidase	GBA		
Q28120	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	QPCT		
Q32LQ0	Glutamyl aminopeptidase	ENPEP		
G3X8D7	Glutathione peroxidase	GPX3		
G3N2N9	Glutathione peroxidase	GPX5		
F1MCF5	Glutathione peroxidase	GPX6		
Q28035	Glutathione S-transferase A1	GSTA1		
A1A4L7	Glutathione S-transferase Mu 1	GSTM4		
E1BH17	Glutathione S-transferase Mu 1	GSTM1		
P28801	Glutathione S-transferase P	GSTP1		
P10096	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH		
Q2KJE5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	GAPDHS		
Q0VCM4	Glycogen phosphorylase, liver form	PYGL		
Q5E9E7	Glycosyltransferase 8 domain-containing protein 1	GLT8D1		
A1L539	Glypican 6	GPC6		
G3X745	Glypican-1	GPC1		

Q2YDG0	G-protein coupled receptor family C group 5 member	GPRC5C		
E1BEM2	Group 3 secretory phospholipase A2	PLA2G3		
P08760	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	AK3		
Q3T054	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN		
Q0V8F2	GTP-binding protein PTD004	PTD004		
P62871	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	GNB1		
Q3SZ00	HADHA protein	HADHA		
Q3ZCH9	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	HDHD2		
Q2TBU0	Haptoglobin	HP		
Q0P565	HD domain-containing protein 2	HDDC2		
Q2TBX4	Heat shock 70 kDa protein 13	HSPA13		
Q27975	Heat shock 70 kDa protein 1A	HSPA1A		
P0CB32	Heat shock 70 kDa protein 1-like	HSPA1L		
A7E3S8	Heat shock 70kD protein binding	ST13		
P19120	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8		
Q3T149	Heat shock protein beta-1	HSPB1		
Q76LV2	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1		
Q76LV1	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1		
P34933	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2		
P01966	Hemoglobin subunit alpha	HBA		
P02070	Hemoglobin subunit beta	HBB		
Q3SZV7	Hemopexin	HPX		
Q3SZV7	Hemopexin	HPX		
Q9MY00	Heparanase	HPSE		
A5D9H5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	HNRPD		
E1BCS3	Hexokinase	HK3		
Q5W5U3	Hexokinase	HK1		
P10103	High mobility group protein B1	HMGB1		
P40673	High mobility group protein B2	HMGB2		
P62958	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1		
Q8SQ21	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	HINT2		
Q2YDJ4	Histidine triad nucleotide-binding protein 3	HINT3		
P02253	Histone H1.2	HIST1H1C		
A1A4R1	Histone H2A type 2-C	HIST2H2AC		
Q3ZBX9	Histone H2A.J	H2AFJ		
F1N453	Histone H2B	HIST2H2BE		

Q32S29	Histone H2B	H2B		
Q5E9F8	Histone H3.3	H3F3A		
G3X807	Histone H4	LOC781223		
P16386	Hormone-sensitive lipase	LIPE		
Q86YZ3	Hornerin	HRNR		
G3MZ19	HRPE773-like	LOC100295741		
F1MSK8	Hyaluronidase	HYAL1		
F1MTV1	Hyaluronidase	SPAM1		
Q3B7M2	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	HAGH		
Q3SYR8	Immunoglobulin J chain	IGJ		
P20456	Inositol monophosphatase 1	IMPA1		
Q2NL29	Inositol-3-phosphate synthase 1	ISYNA1		
P20959	Insulin-like growth factor-binding protein 3	IGFBP3		
Q05717	Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP5		
Q05718	Insulin-like growth factor-binding protein 6	IGFBP6		
Q3T0P7	Integral membrane protein 2B	ITM2B		
Q2TBX9	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 1	ITFG1		
P32592	Integrin beta-2	ITGB2		
Q0VCM5	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	ITIH1		
F1MNV4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2		
Q3T052	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4		
Q28125	Intercellular adhesion molecule 3	ICAM3		
O77482	Interleukin-1 receptor antagonist protein	IL1RN		
Q32LE5	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	ASRGL1		
Q32KX0	Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial	ISOC2		
O77784	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	IDH3B		
Q58D96	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	IDH3G		
F1MN74	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	IDH3A		
Q9XSG3	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1		
Q04467	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2		
Q14CN4	Isoform 1 of Keratin, type II cytoskeletal 72	KRT72		
Q9XT56	Junctional adhesion molecule A	F11R		
Q0VCZ4	Kallikrein-related peptidase 10	KLK10		

P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10		
F1MC11	Keratin, type I cytoskeletal 14	KRT14		
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9		
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1		
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2		
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5	KRT5		
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	KRT6A		
F1MNV5	Kininogen-1	KNG1		
P01045	Kininogen-2	KNG2		
A5PJD4	KLKBL4 protein	KLKBL4		
A4IFP2	KRT4 protein	KRT4		
Q95114	Lactadherin	MFGE8		
G3MXZ0	Lactoperoxidase	LPO		
P24627	Lactotransferrin	LTF		
A4FUZ1	Lactoylglutathione lyase	GLO1		
Q95M12	Legumain	LGMN		
Q2KIF2	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	LRG1		
Q1JPB0	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1		
Q3SZH7	Leukotriene A-4 hydrolase	LTA4H		
F1N110	Lipase	LIPA		
Q2TB10	Lipopolysaccharide-binding protein	LBP		
E1BNS9	L-lactate dehydrogenase	LDHC		
P19858	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA		
Q3T056	L-lactate dehydrogenase A-like 6B	LDHAL6B		
Q5E9B1	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB		
A6QP36	LMAN2 protein	LMAN2		
Q2T9Y2	LOC529047 protein	LOC529047		
A5PJH7	LOC788112 protein	LOC788112		
Q28110	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II	N/A		
P11064	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	ACP1		
F1N0R8	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	SDS		
Q32LD3	Ly6/PLAUR domain-containing protein 4	LYPD4		
Q2LGB2	Lymphocyte antigen 96	MD2		
A6H757	Lysophosphatidic acid phosphatase type 6	ACP6		
Q9MYM4	Lysosomal alpha-glucosidase	GAA		
Q29451	Lysosomal alpha-mannosidase	MAN2B1		
Q3MI05	Lysosomal protective protein	CTSA		

Q2TA14	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP		
Q1JQA0	Lysosomal thioesterase PPT2	PPT2		
Q05204	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1		
Q6B411	Lysozyme C, milk isozyme	N/A		
A0JNM6	Lysozyme-like protein 1	LYZL1		
Q2T9N7	Lysozyme-like protein 4	LYZL4		
Q8MJ24	Lysyl oxidase homolog 4	LOXL4		
A0A0F7RPX0	Macrophage migration inhibitory	MIF		
Q865V6	Macrophage-capping protein	CAPG		
P10279	Major prion protein	PRNP		
Q3T145	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1		
Q32LG3	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2		
F1N3V0	Malic enzyme	ME1		
A6QLI0	Mammalian ependymin-related protein 1	EPDR1		
F1N327	Mannose-6-phosphate isomerase	MPI		
M5FK93	Marapsin-like	PRSS27		
P52176	Matrix metalloproteinase-9	MMP9		
Q08E55	MBTPS1 protein	MBTPS1		
G5E5L5	Melanoma inhibitory activity protein 3	MIA3		
Q2YDM3	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 13	MS4A13		
E1BEV7	Metalloendopeptidase	BMP1		
P16368	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2		
Q0VCJ8	Methyltransferase-like protein 9	METTL9		
Q5E9I4	MGAT1 protein	MGAT1		
A6QPW2	MGC157332 protein	MGC157332		
A5PK67	MGC165862 protein	MGC165862		
P55918	Microfibril-associated glycoprotein 4	MFAP4		
P19879	Mimecan	OGN		
E1BLK7	Mitochondria-eating protein	SPATA18		
P54149	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	MSRA		
A6H797	MLEC protein	MLEC		
Q2HJ49	Moesin	MSN		
Q95122	Monocyte differentiation antigen CD14	CD14		
A6QP39	MSLN protein	MSLN		
P03972	Muellerian-inhibiting factor	AMH		
Q5E9H9	Mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	ABHD10		

P62248	Myeloid-derived growth factor	MYDGF		
P60661	Myosin light polypeptide 6	MYL6		
Q27991	Myosin-10	MYH10		
M5FJT7	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit gamma	GNPTG		
Q1LZH9	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	GNS		
P14769	N-acetyllactosaminide alpha-1,3-galactosyltransferase	GGTA1		
F1MUE3	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	ART3		
F1MCE4	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	LOC407148		
Q6QRN6	NAD(P)H-hydrate epimerase	APOA1BP		
G5E5N5	NADH-cytochrome b5 reductase 1	CYB5R1		
A6QM01	NAGLU protein	NAGLU		
Q5E9Z9	Nectin-4	PVRL4		
Q3SZC4	NSFL1 cofactor p47	NSFL1C		
Q0IIH5	Nucleobindin 2	NUCB2		
Q0P569	Nucleobindin-1	NUCB1		
P52175	Nucleoside diphosphate kinase A 2	NME1-2		
Q3T0Q4	Nucleoside diphosphate kinase B	NME2		
Q32KV6	Nucleotide exchange factor SIL1	SIL1		
A7MBI8	NUDT9 protein	NUDT9		
Q0VCP3	Olfactomedin-like protein 3	OLFML3		
Q0IIH3	Oligodendrocyte myelin glycoprotein	OMG		
Q8MJ50	Osteoclast-stimulating factor 1	OSTF1		
F1MI46	Osteopontin	SPP1		
Q3T0Y1	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1	OTUB1		
A5PK71	PACRG protein	PACRG		
P45478	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1		
M5FKI8	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like	LOC100295702		
Q58CQ9	Pantetheinase	VNN1		
A5PKJ8	PCDHGA8 protein	PCDHGA8		
A6QNV3	PCDHGB4 protein	PCDHGB4		
A4IFR2	PCSK1N protein	PCSK1N		
A4IFC0	PDGFD protein	PDGFD		
A6QNL5	PDIA6 protein	PDIA6		
A1A4Q6	Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	PI3		
Q8SPP7	Peptidoglycan recognition protein 1	PGLYRP1		
F1MZN4	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	PAM		

Q2NKS8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	LOC526524		
P62935	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA		
P80311	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B PPIB	PPIB		
P18203	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A		
Q5E947	Peroxiredoxin-1	PRDX1		
Q9BGI3	Peroxiredoxin-2	PRDX2		
Q9BGI2	Peroxiredoxin-4	PRDX4		
Q9BGI1	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5		
O77834	Peroxiredoxin-6	PRDX6		
Q865R1	Peroxisomal N(1)-acetyl- spermine/spermidine oxidase	PAOX		
A6QQ11	PGM2 protein	PGM2		
P13696	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1		
Q3T010	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4	PEBP4		
Q08DP0	Phosphoglucomutase-1	PGM1		
Q3T0P6	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1		
Q3SZ62	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1		
Q32KV0	Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2		
Q2T9S4	Phosphoglycolate phosphatase	PGP		
Q1RML9	Phospholipase A2, group VII (Platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	PLA2G7		
Q9GL30	Phospholipase B-like 1	PLBD1		
Q58DL9	Phospholipid transfer protein	PLTP		
Q95121	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1		
V6F953	Placenta-expressed transcript 1 protein	PLET1		
Q9N2I2	Plasma serine protease inhibitor	SERPINA5		
P06868	Plasminogen	PLG		
A7E3Q8	Plastin-3	PLS3		
Q28017	Platelet-activating factor acetylhydrolase	PLA2G7		
V6F7P3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	PAFAH1B2		
Q5BIP2	Platelet-derived growth factor receptor-like protein	PDGFRL		
A0JN47	Plexin domain containing 2	PLXDC2		
Q17QC7	Poliovirus receptor-related 2 (Herpesvirus entry mediator B)	PVRL2		
P81265	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR		
G5E6M1	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR		

F1N4Q3	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT7		
F1N554	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT10		
Q07537	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	GALNT1		
Q6QRN7	PP1201 protein	RECS1		
A6QLY7	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	PBXIP1		
Q29437	Primary amine oxidase, liver isozyme	N/A		
Q3T0I2	Pro-cathepsin H	CTSH		
O77588	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1		
P02584	Profilin-1	PFN1		
Q32PB1	Profilin-3	PFN3		
Q3ZBH5	Proliferation-associated 2G4, 38kDa	PA2G4		
Q32L99	Prostaglandin reductase 2	PTGR2		
O02853	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS		
A6H730	Prostatic acid phosphatase	ACPP		
M5FI38	Protease, serine, 22-like	PRSS22		
Q4U5R3	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1		
Q5E9G3	Proteasome activator complex subunit 2	PSME2		
F1MKX4	Proteasome activator complex subunit 4	PSME4		
E1BD83	Proteasome subunit alpha type	PSMA8		
G5E5C3	Proteasome subunit alpha type	PSMA6		
Q3T0X5	Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1		
Q3T0Y5	Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2		
Q58DU5	Proteasome subunit alpha type-3	PSMA3		
Q3ZCK9	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4		
Q5E987	Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5		
Q2TBX6	Proteasome subunit beta type-1	PSMB1		
Q5E9K0	Proteasome subunit beta type-2	PSMB2		
P33672	Proteasome subunit beta type-3	PSMB3		
Q3T108	Proteasome subunit beta type-4	PSMB4		
Q32KL2	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5		
F1N443	Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5		
F1MTI7	Protein CutA	CUTA		
Q5E946	Protein deglycase DJ-1	PARK7		
P05307	Protein disulfide-isomerase	P4HB		
P38657	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3		
Q29RV1	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4		

A5PKI3	Protein FAM3C	FAM3C		
Q2KIP3	Protein FAM71F1	FAM71F1		
Q2KIT0	Protein HP-20 homolog	N/A		
Q2KIX7	Protein HP-25 homolog 1	N/A		
Q2KIU3	Protein HP-25 homolog 2	N/A		
Q2HJE5	Protein ITFG3	ITFG3		
A7MB28	Protein NDRG3	NDRG3		
Q3MHX6	Protein OS-9	OS9		
Q3T0W4	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	PPP1R7		
F1MX83	Protein S100	S100A11		
P79105	Protein S100-A12	S100A12		
Q3MHP3	Protein S100-A14	S100A14		
P10462	Protein S100-A2	S100A2		
P28782	Protein S100-A8	S100A8		
E1BLI9	Protein S100-A9	S100A9		
F1MIC8	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	TGM3		
Q3SYY2	Protein-tyrosine sulfotransferase 2	TPST2		
F1MME1	Protein-tyrosine-phosphatase	PTPRK		
G3MXS7	Protein-tyrosine-phosphatase	PTPRG		
P55859	Purine nucleoside phosphorylase	PNP		
Q2KIY5	Putative phospholipase B-like 2	PLBD2		
Q3ZBV6	Putative uncharacterized protein LOC777594	LOC777594		
Q2KIV7	Pyrophosphatase (Inorganic) 2	PPA2		
Q2T9Y3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	PDHA2		
P11966	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB		
A5D984	Pyruvate kinase	PKM2		
P21856	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI1		
P50397	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2		
Q3ZBG1	RAB14 protein	RAB14		
Q3ZBD1	RAB1A, member RAS oncogene family	RAB1A		
Q148J4	RAB2A, member RAS oncogene family	RAB2A		
Q3B7N3	RAN binding protein 6	RANBP6		
Q3MHP2	Ras-related protein Rab-11B	RAB11B		
A6QR46	Ras-related protein Rab-6B	RAB6B		
P62833	Ras-related protein Rap-1A	RAP1A		
F1N7F3	Receptor protein-tyrosine kinase	EGFR		

Z4YHD9	Receptor protein-tyrosine kinase	MET		
A7MBJ4	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	PTPRF		
P81134	Renin receptor	ATP6AP2		
Q762I5	Resistin	RETN		
Q0VCQ9	Reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	RCN2		
Q0P5D6	Retinoic acid receptor responder (Tazarotene induced) 1	RARRES1		
P18902	Retinol-binding protein 4	RBP4		
Q58DT6	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDI A		
Q9TU03	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDI B		
P15467	Ribonuclease 4	RNASE4		
W0UV03	Ribonuclease A C1	RAC1		
P08904	Ribonuclease K6	RNASE6		
Q3T114	Ribonuclease UK114	HRSP12		
Q3T186	Ribose-5-phosphate isomerase	RPIA		
Q2HJ58	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	PRPS1		
Q3T0Y9	RING finger protein 186	RNF186		
Q0III8	RNASET2 protein	RNASET2		
F1N058	Ropporin-1	ROPN1		
A6QR35	SCAMP2 protein	SCAMP2		
A6QPK0	SCGB2A2 protein	SCGB2A2		
A0JNP2	Secretoglobin family 1D member	SCGB1D		
Q58DF6	Secretory carrier-associated membrane protein 4	SCAMP4		
A7MB70	Semaphorin-3C	SEMA3C		
P81019	Seminal plasma protein BSP-30 kDa	N/A		
P02784	Seminal plasma protein PDC-109	N/A		
Q2NKZ9	Serine carboxypeptidase 1	SCPEP1		
Q1LZE9	Serine protease 23	PRSS23		
F1N152	Serine protease HTRA1	HTRA1		
A0JNI4	Serine racemase	SRR		
F1MBQ1	Serine/threonine-protein phosphatase	PPEF1		
Q32PI5	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A		
Q2KJ44	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PPP2R4		
P61287	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC		
Q29443	Serotransferrin	TF		

Q9TTE1	Serpin A3-1	SERPINA3-1		
A0A0A0MP92	Serpin A3-7	SERPINA3-7		
A6QPQ2	Serpin A3-8	SERPINA3-8		
A6QPZ4	SERPINB4 protein	SERPINB4		
A4FV69	SERPINB5	SERPINB5		
A6QPP2	SERPIND1 protein	SERPIND1		
P02769	Serum albumin	ALB		
Q8SQ28	Serum amyloid A protein	Saa3		
Q6T181	Sex hormone-binding globulin	SHBG		
Q08E20	S-formylglutathione hydrolase	ESD		
A6QPY4	SGSH protein	SGSH		
Q3ZCL8	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3BGRL3		
Q3ZBF6	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADS		
A6BMK7	Sialidase-1	NEU1		
A5D960	Sialyltransferase 4A	ST3GAL1		
F1MNJ2	Signal recognition particle receptor subunit alpha	SRPR		
Q2HJF0	Similar to Serotransferrin	N/A		
Q08DL0	SLC3A2 protein	SLC3A2		
P61955	Small ubiquitin-related modifier 2	SUMO2		
E1B8N5	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	ATP1A4		
Q3T0C6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	ATP1B3		
P58352	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	SLC2A3		
P58353	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	SLC2A5		
Q58D31	Sorbitol dehydrogenase	SORD		
Q0IIA3	Sorcin	SRI		
P13213	SPARC	SPARC		
Q3SYW7	SPARC-like 1 (Hevin)	SPARCL1		
Q2YDG7	Sperm acrosome membrane-associated protein 1	SPACA1		
A6QQ77	Sperm acrosome membrane-associated protein 3	SPACA3		
Q32KL7	Sperm equatorial segment protein 1	SPESP1		
F1MI43	Sperm surface protein Sp17	SPA17		
P82292	Spermadhesin Z13	spadh2		
P29392	Spermadhesin-1	SPADH1		
Q0VD19	Sphingomyelin phosphodiesterase	SMPD1		
Q2KIW7	ST6GAL1 protein	ST6GAL1		
Q9N0T1	Stanniocalcin-1	STC1		
Q3ZCH0	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9		

A7MAZ2	STX12 protein	STX12		
P31039	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA		
Q58DR8	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	SUCLG1		
Q3MHX5	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	SUCLG2		
Q24JZ7	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	OXCT1		
Q0P5L5	Sulfatase-modifying factor 1	SUMF1		
F1MM32	Sulfhydryl oxidase	QSOX1		
E1BP03	Sulfotransferase	HS3ST3B1		
P00442	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1		
P41976	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2		
Q2YDD6	Synaptogyrin-4	SYNGR4		
Q3SZA6	Syndecan binding protein (Syntenin)	SDCBP		
Q3ZBT5	Syntaxin-7	STX7		
A8PVV5	SYPL1 protein	SYPL1		
Q32L40	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1		
Q3ZBH0	T-complex protein 1 subunit beta	CCT2		
F1N0E5	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4		
Q2NKZ1	T-complex protein 1 subunit eta	CCT7		
Q3T0K2	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3		
Q3ZCI9	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8		
Q3MHL7	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A		
F1MP48	T-complex protein 1 subunit zeta-2	CCT6B		
Q3T084	T-complex protein 1 subunit zeta-2	CCT6B		
Q2KIS7	Tetranectin	CLEC3B		
G8JKX6	Tetraspanin	CD9		
A6QPE3	TEX101 protein	TEX101		
A6QQ83	THEM2 protein	THEM2		
Q1JPJ8	Thimet oligopeptidase	THOP1		
G8JKZ8	Thioredoxin	TXN		
G1K1Q2	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	TXNRD1		
Q28178	Thrombospondin-1	THBS1		
Q3SX33	Thy-1 cell surface antigen	THY1		
Q2KIM0	Tissue alpha-L-fucosidase	FUCA1		
Q2KIT8	Tissue specific transplantation antigen P35B	TSTA3		
Q2LGB5	Toll-interacting protein	TOLLIP		

A5PK75	TOR1A protein	TOR1A		
A5PKH0	TOR1AIP2 protein	TOR1AIP2		
Q58DR3	Transaldolase	TALDO1		
Q9XSC9	Transcobalamin-2	TCN2		
Q5E9F5	Transgelin-2	TAGLN2		
Q3ZBT1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP		
A7E3W4	Transketolase	TKT		
Q08DM8	Translin	TSN		
Q0VCX3	Transmembrane 4 L six family member 1	TM4SF1		
Q5E971	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMED10		
A2VDV7	Transmembrane protease, serine 2	TMPRSS2		
O46375	Transthyretin	TTR		
Q58DK4	Triokinase/FMN cyclase	TKFC		
Q5E956	Triosephosphate isomerase	TPI1		
Q0V8B6	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1		
F1N0M0	Tripeptidyl-peptidase 2	TPP2		
Q5KR47	Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3		
P17248	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	WARS		
Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	TUBA3		
P81948	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A		
Q2HJB8	Tubulin alpha-8 chain	TUBA8		
Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B		
Q3T077	Tubulin polymerization-promoting protein family member 2	TPPP2		
Q08DN1	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	TNFRSF21		
Q0VD44	Twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	TWSG1		
P23356	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1		
Q2TBG8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	UCHL3		
P63048	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52		
F1MC72	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3		
A3KMV5	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1		
Q32LF7	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4	B4GALT4		
Q58DG1	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	N/A		
F1N0Y0	Uridine phosphorylase	UPP1		

Q07130	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UGP2		
F1N6I7	Versican core protein	VCAN		
G3X752	Vesicle-associated membrane protein 3	VAMP3		
Q3T0Y8	Vesicle-associated membrane protein 8	VAMP8		
Q0VCY1	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	VAPA		
P48616	Vimentin	VIM		
P81401	VIP peptides	VIP		
Q3MHN5	Vitamin D-binding protein	GC		
P07224	Vitamin K-dependent protein S	PROS1		
P31404	V-type proton ATPase catalytic subunit A	ATP6V1A		
P31408	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	ATP6V1B2		
Q32LB7	V-type proton ATPase subunit E 2	ATP6V1E2		
Q28029	V-type proton ATPase subunit F	ATP6V1F		
P40682	V-type proton ATPase subunit S1	ATP6AP1		
Q2KJH4	WD repeat-containing protein 1	WDR1		
Q5QQ49	Xylosyltransferase 2	XYLT2		
O97764	Zeta-crystallin	CRYZ		
Q3ZCH5	Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1		

ANEXO H – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE CAPRINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2
B9VGZ9	13kDa differentiation-associated protein	N/A		
P62262	14-3-3 protein epsilon	YWHAE		
H9CJU6	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ		
A5YVD9	45 kDa calcium-binding protein	SDF4		
P00349	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD		
D3Y602	A proliferation-inducing ligand	N/A		
W5P9I9	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACSS1		
G3M9U4	Acid phosphatase type 5	ACP5		
W5PZ94	Aconitate hydratase	ACO1		
W5QAA9	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2		

P10626	Acrosin	ACR		
W5QFL6	Acrosin	ACR		
P60713	Actin, cytoplasmic 1	ACTB		
W5NU67	Acylphosphatase (Fragment)	MLH3		
W5PHX1	Adenosylhomocysteinase	AHCY		
W5QI77	Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2		
C5IJA8	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1		
C5IWU3	ADP-ribosylation factor 3	ARF3		
C5IWT0	ADP-ribosylation factor 4	ARF4		
C5IWU1	ADP-ribosylation factor 6	ARF6		
C5IWT9	ADP-ribosylation factor-like 8B	ARL8B		
U5ILF5	Aldoketoreductase 1B5	N/A		
W5PGC5	Aldose 1-epimerase	GALM		
W5NWQ7	Alkaline phosphatase	LOC101109677		
W5PFB9	Alkaline phosphatase	ALPL		
Q28745	Alpha globin chain	N/A		
W5QJ42	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	FUT8		
Q6SVU1	Alpha-1,3-galactosyltransferase	GGTA1		
W5QHN3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase (Fragment)	PYGL		
B6D983	Alpha-1-acid glycoprotein	AGP		
A8E1W0	Alpha-2,3-sialyltransferase	st3gal4		
J7F5B7	Alpha-mannosidase	MAN2B1		
W5PLN7	Alpha-mannosidase	N/A		
W5PMZ6	Alpha-mannosidase	LOC101117846		
W5PM86	Alpha-mannosidase	N/A		
W5NWN2	Alpha-mannosidase	MAN2C1		
W5P1J8	Amine oxidase	AOC3		
W5NUW3	Amine oxidase	N/A		
Q4W1E4	Angiotensin-I converting enzyme	ace		
P20757	Angiotensinogen	AGT		
W5PSZ5	Annexin	ANXA1		
W5QEU6	Annexin	ANXA4		
W5PZM9	Annexin	ANXA5		
A2SW69	Annexin A2	ANXA2		
W5PWY0	Arginase	ARG1		
B0LRN6	Asparaginase-like 1 protein	N/A		
W5NUG0	Aspartate aminotransferase	GOT2		
W5PS88	Aspartate aminotransferase	GOT1		
G1DG30	Aspartate aminotransferase	GOT1		
S6ASC3	ATP synthase subunit a	MT-ATP6		
W5NY50	ATP synthase subunit alpha	ATP5A1		

W5PEP7	ATP synthase subunit beta	ATP5B		
Q09GP3	ATP-binding cassette sub-family G member 2	ABCG2		
Q2TCH3	ATP-citrate synthase	ACLY		
W5QDD4	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	PFKM		
S5U2L5	Bactericidal permeability increasing	BPI		
W8SWB6	Bactericidal permeability-increasing protein	N/A		
Q1KYZ9	Beta globin chain	HBB		
F5CC79	Beta-1,4-galactosyltransferase I	B4GALT1		
Q6QAT4	Beta-2-microglobulin	B2M		
W5Q1M0	Beta-galactosidase	GLB1		
W5P3N6	Beta-hexosaminidase	LOC101112162		
W5QC89	Beta-hexosaminidase	HEXA		
W5P3C6	Beta-hexosaminidase	HEXB		
Q95327	Beta-mannosidase	MANBA		
A1Z181, A1Z182, A1Z183	Bodhesin-2, Bodhesin-3, Bodhesin-4	Bdh-2, Bdh-3, Bdh-4		
A0A075W0S2	BPI fold containing family A member 1	BPIFA1		
S5LQM4	BPI fold containing family A member 1 protein	BPIFA1		
Q6YNX6	Calmodulin	CALM2		
F1DAU3	Calpain 1 catalytic subunit	CAPN1		
Q1PCR9	Calpain II small subunit	N/A		
W5P925	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	PRKACA		
B6Z9S4	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit alpha 1	N/A		
W5PTU7	Carbonic anhydrase 2	CA2		
W5QB42	Carboxylic ester hydrolase	CES5A		
W5PAM4	Carboxypeptidase	CTSA		
P67829	Casein kinase I isoform alpha	CSNK1A1		
C6KGS5	Catalase	CAT		
S5FR89	Cathepsin B	CTSB		
X2J1X8	Cathepsin D	CTSD		
W5PBB5	Cathepsin F	CTSF		
W8NX99	Cathepsin L	N/A		
W5QGU9	Cation-transporting ATPase	ATP13A4		
M4WED3	Cell division cycle 42	CDC42		
D6QUQ1	Chloride anion exchanger	SLC26A3		
W5P610	Chloride intracellular channel protein	CLIC1		
G1DFQ5	Chloride intracellular channel protein	CLIC1		

C5IWT4	Chromosome 21 open reading frame 33	C21orf33		
W5PI38	Citrate synthase	CS		
Q9MZB4	Class mu glutathione S-transferase (Fragment)	N/A		
W5PZI1	Clusterin	LOC101113728		
A5YBU8	Complement component C2	C2		
O46544	Complement component C3 (Fragment)	C3		
P56283	C-type natriuretic peptide	NPPC		
K4P494	Cystatin C	CST3		
D6PX60	Cysteine-rich secretory protein 1	Crisp1		
D6PX61	Cysteine-rich secretory protein 2	Crisp2		
A0A023NDA9	Cytochrome c oxidase subunit II (Fragment)	COX2		
W5QHK5	DCN1-like protein (Fragment)	DCUN1D1		
W5PMF2	Diacylglycerol kinase	DGKA		
W5PB39	Dihydrolipoyl dehydrogenase	DLD		
W5NZA0	Dipeptidase	DPEP3		
A0A075TCY1	Dipeptidylpeptidase 4	DPP4		
W5Q5P0	DnaJ homolog subfamily C member 10	DNAJC10		
G1DGE3	Dynein light chain 2	DYNLL2		
W5PN24	Elongation factor 1-alpha	EEF1A2		
W5PD15	Elongation factor 1-alpha	LOC101120236		
B2LYK8	Endoplasmic reticulum protein 29	ERP29		
Q30DU1	Epidermal growth factor receptor	EGFR		
W5PZH7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	EIF3E		
W5QHX1	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A2		
B9VH00	Fatty acid binding protein 5	FABP5		
Q06B57	Fatty acid synthase	FASN		
W5PA59	Ferritin	LOC101117015		
W5Q5H8	Fibrinogen alpha chain	FGA		
C8BKC8	Four and a half LIM domains 1 protein	FHL1		
W5PFR8	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1		
W5P1X9	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA		
W5NQP9	Fructose-bisphosphate aldolase (Fragment)	ALDOC		
C5I WV1	Fumarate hydratase	FH		
W5PHB8	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	GALT		
C5IJ94	GDI1	N/A		
W5Q0A8	Glucosamine-6-phosphate isomerase	GNPDA2		

W5P323	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI		
G9BHQ2	Glucosylceramidase	GBA		
W5QBP6	Glutamine synthetase	GLUL		
C8BKD8	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	QPCT		
W5PDJ6	Glutathione peroxidase	GPX3		
H9TN93	Glutathione peroxidase	GPx5		
W5Q8B1	Glutathione peroxidase	GPX6		
Q30B87	Glutathione transferase M3	N/A		
Q28554	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH		
W5Q024	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	GPD1L		
W5PVD4	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	AK3		
A4F2F7	Guanine nucleotide binding protein alpha inhibiting 2 (Fragment)	Gi2		
B6E141	Haptoglobin	HP		
M4NBE4	Heat shock 70kDa protein 5	HSPA5		
I6ZQY0	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8		
J7F274	Heat shock protein 70kDa protein 6 (Fragment)	hspa6		
A9P323	Heat shock protein alpha 90	HSPCA		
G1DFU5	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1		
Q9TUG3	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2		
W5P659	Hexokinase	HK1		
W5QFM1	Histone H2A	LOC101106292		
W5QFQ2	Histone H4	HIST1H4D		
D0F094	Hormone-sensitive lipase	LIPE		
R9Y0L2	Hormone-sensitive lipase	HSL		
I3WAE6	HSP27 protein	HSP27		
W5NSU1	Hyaluronidase	LOC101107188		
Q8SQG7	Hyaluronidase-2	HYAL2		
B6UV59	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl- coenzyme A thiolase/enoyl- coenzyme A hydratase (Trifunctional protein) alpha subunit	HADHA		
A0A097C2Z2	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT1		
F6M3U6	Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP-5		
F1ASZ5	Interferon-gamma-inducible lysosomal thiol reductase	GILT		
W5P8N9	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	IDH3B		

W5P958	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	IDH3G		
W5NR14	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	IDH3A		
W5QCD6	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	IDH1		
B3VSB9	ITM2B	ITM2B		
W5NZX3	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	KATNAL2		
B6ZCR1	Lactoferrin	lrf		
W5Q0T3	Lactoylglutathione lyase	GLO1		
W5PRR5	Leukotriene A(4) hydrolase	LTA4H		
A0A059U2L1	Lipocalin	N/A		
A0A059U1E3	Lipocalin 8	LCN8		
W5PIN6	L-lactate dehydrogenase	LDHA		
W5NXL6	L-lactate dehydrogenase	LDHAL6B		
W5PIF6	L-lactate dehydrogenase	LDHC		
W5P994	Lon protease homolog	LONP1		
W8R447	Lysophospholipase I	LYPLA1		
F2X044	Lysozyme-like 4	LYZL4		
Q1ZZU7	Macrophage migration inhibitory factor	MIF		
Q9N104	Malate dehydrogenase	MDH2		
W5QFQ0	Malate dehydrogenase	MDH1		
C8CC56	Malic enzyme	ME1		
W5NY53	Mannose-6-phosphate isomerase	MPI		
Q8SQ25	Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor (Fragment)	m6p/igf2r		
Q9XSQ8	MAP28 protein	map28		
C8BKE4	Matrix metalloproteinase 2	MMP2		
B6UV58	Matrix metalloproteinase 7	MMP7		
Q9N0N7	Membrane selenoprotein P	N/A		
C8BKC3	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2		
G1DFX3	Methyltransferase-like protein 9	METTL9		
A4ZVY5	MHC class I antigen (Fragment)	ovar		
C7FDJ1	Milk fat globule-EGF factor 8	MFGE8		
G1DGG1	Mitochondrial 10 kDa heat shock protein	HSPE1		
B9VH06	Mitochondrial ATP synthase O subunit	ATP5O		
I1SKJ7	Mitochondrial sulfite oxidase	N/A		
Q0PD85	Monocarboxylate transporter 1	SLC16A1		
P02190	Myoglobin	MB		
B2LSM7	N-acetylgalactosaminidase alpha	N/A		
W5QB71	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	AMDHD2		

P50426	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	GNS		
W5Q4D9	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	ART3		
G1DFS3	NAD-dependent deacetylase sirtuin-5	SIRT5		
Q30B76	Niemann-Pick disease type C2	N/A		
W5NYH2	Nucleoside diphosphate kinase	NME1		
A1YZ35	Osteoglycin	OGN		
W5QGG3	Palmitoyltransferase	ZDHHC19		
W5PD71	Pentaxin	CRP		
W5Q3X2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	N/A		
K4P1S5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIA		
W5QHU9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIB		
C8BKC5	Peroxiredoxin 2	PRDX2		
M4T8F1	Peroxiredoxin 6	Prdx6		
L0CSP6	Peroxiredoxin-5	PRDX5		
B7TJ13	Phosphoglycerate kinase	PGK1		
W5PG09	Phosphoglycerate kinase	PGK2		
W5QH40	Phosphoinositide phospholipase C	PLCZ1		
W5PKM1	Phospholipid-transporting ATPase	ATP11C		
W5PT19	Phospholipid-transporting ATPase	ATP8B3		
W5PTI5	Phospholipid-transporting ATPase	LOC101115135		
P81286	Plasminogen (Fragment)	PLG		
W5NYS0	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT2		
W5PJ21	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT10		
W5PN17	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (Fragment)	GALNT12		
P05979	Prostaglandin G/H synthase 1	PTGS1		
Q9XSM0	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS		
W5NS93	Proteasome subunit alpha type	PSMA4		
W5P9U4	Proteasome subunit alpha type	PSMA1		
K4P231	Proteasome subunit alpha type	PSMA2		
W5QD30	Proteasome subunit alpha type	PSMA5		
W5PC09	Proteasome subunit alpha type	PSMA6		
W5PB07	Proteasome subunit alpha type	PSMA8		
W5QIY3	Proteasome subunit alpha type	PSMA3		
W5P7G7	Proteasome subunit beta type	PSMB6		
W5QDM2	Proteasome subunit beta type	PSMB5		
W5QE19	Proteasome subunit beta type	PSMB2		
W5P500	Proteasome subunit beta type	PSMB1		
W5QIL2	Proteasome subunit beta type	PSMB4		

W5PJC2	Proteasome subunit beta type	PSMB3		
W5QDN6	Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5		
W5QC35	Protein disulfide-isomerase	PDIA4		
W5PMM7	Protein disulfide-isomerase	PDIA3		
W5Q9H2	Protein disulfide-isomerase	P4HB		
W5NY22	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PCMT1		
W5PYS5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	PDHA1		
W5QC41	Pyruvate kinase	PKM		
C5IJ84	RAB10	N/A		
A9LM13	RAB14	rab14		
A9LM09	RAB1A-like protein	RAB1A		
C5IJ98	RAB5A	N/A		
I1VE56	RAS oncogene protein	RAB8A		
A5JSV6	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1		
I1W1N4	Ras-related protein Rab-11B	RAB11B		
I1W1N0	Ras-related protein Rab-2A	RAB2A		
I1W1N1	Ras-related protein Rap-1B	RAP1B		
W5PWC5	Receptor protein-tyrosine kinase	EGFR		
G1DFN7	Ribonuclease K6	RNASE6		
P80601	Ribonuclease UK114	HRSP12		
W5P374	Ribosomal protein L15	RPL15		
W5PWZ7	Serine/threonine-protein phosphatase	PPEF1		
W5Q7U7	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP1CC		
W5PWN6	Serine/threonine-protein phosphatase (Fragment)	CDKL3		
W5PG83	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PPP2R4		
G1DGI1	Serpine 2 protein	SERPINE2		
P14639	Serum albumin	ALB		
B2MVX5	SLC25A20	N/A		
W5PEY3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	ATP1A4		
W5P945	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta	ATP1B3		
P47843	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	SLC2A3		
Q8WMN1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	SLC2A5		
P07846	Sorbitol dehydrogenase	SORD		
W5QIT0	Sorbitol dehydrogenase	SORD		
D7R6C7	Sperm lysozyme like protein 1	SLLP1		

W5PLM3	Sperm surface protein Sp17	SPA17		
C6ZEA8	Sperm-egg fusion 1	Izumo1		
C8BKD7	Sphingomyelin phosphodiesterase	SMPD1		
A5JV04	Stabilin-1 interacting chitinase-like protein	N/A		
W5Q216	Succinate dehydrogenase (quinone)	SDHA		
W5PL67	Succinyl-CoA ligase subunit beta	SUCLG2		
W5PEA4	Succinyl-CoA ligase subunit beta	SUCLA2		
W5PGM1	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	OXCT1		
W5QFN4	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	LOC101120376		
W5Q9K1	Sulfhydryl oxidase	QSOX1		
W5NW86	Sulfotransferase	CHST1		
W5P340	Superoxide dismutase	SOD2		
Q5FB29	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1		
W5NQP5	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD3		
W5PQ18	Synaptogyrin	SYNGR4		
W5QH64	Synaptosomal-associated protein	SNAP23		
W5P375	T-complex protein 1 subunit alpha (Fragment)	TCP1		
W5QFZ3	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4		
W5P765	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment)	CCT3		
W5PSZ6	Testis anion transporter 1	SLC26A8		
H9TKZ8	Transaldolase	TALDO		
W5PE01	Transgelin TAGLN2	TAGLN2		
W5Q5G8	Transketolase	TKT		
W5Q743	Transporter	LOC101119236		
P12303	Transthyretin	TTR		
W5P5W9	Triosephosphate isomerase	TPI1		
D0VWZ0	Tubulin alpha chain	N/A		
D0VWY9	Tubulin beta chain	N/A		
G1DG95	Tumor susceptibility 101 protein	TSG101		
C5ISB7	Ubiquilin 1	UBQLN1		
W5PUL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	UCHL1		
W5P621	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP7		
W5Q922	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	LOC101105383		
P0C276	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52		
Q30B73	UDP-N-acetylglucosamine:alpha-3-D-mannoside beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I (Fragment)	N/A		

I6U6S0	UMP-CMP kinase	CMPK1		
W5PX03	XRP2	RP2		

ANEXO I – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2
W5NRT6	Acetyl-CoA carboxylase 1	ACACA		
W5P9I9	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACSS1		
W5QAA9	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2		
W5QFL6	Acrosin	ACR		
W5NU67	Acylophosphatase	MLH3		
W5PHX1	Adenosylhomocysteinase	AHCY		
W5QI77	Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2		
W5PGC5	Aldose 1-epimerase	GALM		
W5PFB9	Alkaline phosphatase	ALPL		
W5QHZ1	Alkaline phosphatase	LOC101109677		
W5PLN7	Alpha-mannosidase	N/A		
W5PM86	Alpha-mannosidase	N/A		
W5PMZ6	Alpha-mannosidase	LOC101117846		
W5QC34	Alpha-mannosidase	MAN2A1		
W5NWN2	Alpha-mannosidase	MAN2C1		
W5PS45	Alpha-mannosidase (Fragment)	MAN2B1		
W5P1J8	Amine oxidase	AOC3		
W5NUW3	Amine oxidase	AOC3		
W5Q0C6	Amyloid beta A4 protein	APP		
W5PCN2	Annexin	ANXA7		
W5PZM9	Annexin	ANXA5		
W5QBJ0	Annexin	ANXA3		
W5PSZ5	Annexin	ANXA1		
W5P1Q0	AP complex subunit beta	AP1B1		
W5P8Q0	AP complex subunit beta	AP2B1		
W5PS88	Aspartate aminotransferase	GOT1		
W5NUG0	Aspartate aminotransferase	GOT2		
W5NY50	ATP synthase subunit alpha	ATP5A1		
W5PEP7	ATP synthase subunit beta	ATP5B		
W5QDD4	ATP-dependent 6-	PFKM		

	phosphofructokinase			
W5Q1M0	Beta-galactosidase	GLB1		
W5QC89	Beta-hexosaminidase	HEXA		
W5P3C6	Beta-hexosaminidase	HEXB		
W5Q292	Calcium-transporting ATPase	ATP2B1		
W5PTU7	Carbonic anhydrase 2	CA2		
W5QB42	Carboxylic ester hydrolase	CES5A		
W5PAM4	Carboxypeptidase	CTSA		
W5QB36	Catalase	CAT		
W5Q0Z2	Cathepsin B	CTSB		
W5QGU9	Cation-transporting ATPase	ATP13A4		
W5PAD4	Chloride anion exchanger	SLC26A3		
W5P610	Chloride intracellular channel protein	CLIC1		
W5P8X9	Chloride intracellular channel protein	CLIC4		
W5PI38	Citrate synthase	CS		
W5PZI1	Clusterin	LOC101113728		
A5YBU9	Complement factor B	CFB		
W5Q9U3	C-type natriuretic peptide	CNP		
W5NTB3	Cystatin-B	CST6		
W5NZA0	Dipeptidase	DPEP3		
W5PD15	Elongation factor 1-alpha	LOC101120236		
W5QHX1	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A2		
W5PRH3	Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6		
W5PA59	Ferritin	LOC101117015		
W5Q5H8	Fibrinogen alpha chain	FGA		
W5NQP9	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOC		
W5P1X9	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA		
W5PHB8	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	GALT		
W5NUG3	Glucosamine-6-phosphate isomerase	GNPDA1		
W5Q0A8	Glucosamine-6-phosphate isomerase	GNPDA2		
W5P323	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI		
W5P1A5	Glucosylceramidase	GBA		
W5QBP6	Glutamine synthetase	GLUL		
W5Q8B1	Glutathione peroxidase	GPX6		
W5Q824	Glutathione S-transferase	GSTA1		
W5PVD4	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	AK3		
W5NYB7	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	GNG10		

W5PP04	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	GNG12		
W5P659	Hexokinase	HK1		
W5QFM1	Histone H2A	LOC101106292		
W5PUU8	Histone H2A	HIST2H2AC		
W5Q8W8	Histone H3	H3F3A		
W5QGB5	Histone H4	LOC105603795		
W5NSU1	Hyaluronidase	LOC101107188		
W5QCD6	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	IDH1		
W5NZX3	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	KATNAL2		
W5Q0T3	Lactoylglutathione lyase	GLO1		
W5PRR5	Leukotriene A(4) hydrolase	LTA4H		
W5PIN6	L-lactate dehydrogenase	LDHA		
W5NXL6	L-lactate dehydrogenase	LDHAL6B		
W5PIF6	L-lactate dehydrogenase	LDHC		
W5QGD1	L-lactate dehydrogenase	LDHB		
W5NQW1	Lysozyme	LOC101117313		
W5QFQ0	Malate dehydrogenase	MDH1		
W5PC82	Malic enzyme	ME1		
W5NY53	Mannose-6-phosphate isomerase	MPI		
W5PRP1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF	SLC9A3R1		
W5QB71	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	AMDHD2		
W5Q4D9	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	ART3		
W5NXM8	NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	LOC101118216		
W5Q595	NIF3-like protein 1	NIF3L1		
W5NYH2	Nucleoside diphosphate kinase	NME1		
W5Q4H9	Nucleoside diphosphate kinase	NME3		
W5PD71	Pentaxin	CRP		
W5Q3X2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	N/A		
W5QB61	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	FKBP1A		
W5QHU9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PIIB		
W5PG09	Phosphoglycerate kinase	PGK2		
W5QBV3	Phosphoglycerate kinase	PGK1		
W5Q2D6	Phosphoinositide phospholipase C	PLCL1		
W5QH40	Phosphoinositide phospholipase C	PLCZ1		
W5PTI5	Phospholipid-transporting ATPase	LOC101115135		
W5PT19	Phospholipid-transporting ATPase	ATP8B3		
W5PKM1	Phospholipid-transporting ATPase	ATP11C		
W5PS11	Phosphoserine aminotransferase	PSAT1		

W5PDL7	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT5		
W5PN17	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT12		
W5PJ21	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT10		
W5P9U4	Proteasome subunit alpha type	PSMA1		
W5PC09	Proteasome subunit alpha type	PSMA6		
W5PB07	Proteasome subunit alpha type	PSMA8		
W5NS93	Proteasome subunit alpha type	PSMA4		
W5Q7C7	Proteasome subunit alpha type	PSMA2		
W5QIY3	Proteasome subunit alpha type	PSMA3		
W5QD30	Proteasome subunit alpha type	PSMA5		
W5PJC2	Proteasome subunit beta type	PSMB3		
W5QDM2	Proteasome subunit beta type	PSMB5		
W5PVU5	Proteasome subunit beta type	PSMB7		
W5P500	Proteasome subunit beta type	PSMB1		
W5QIL2	Proteasome subunit beta type	PSMB4		
W5QE19	Proteasome subunit beta type	PSMB2		
W5QDN6	Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5		
W5PMM7	Protein disulfide-isomerase	PDIA3		
W5Q9H2	Protein disulfide-isomerase	P4HB		
W5QC35	Protein disulfide-isomerase	PDIA4		
W5NQH6	Protein S100	S100A9		
W5NQJ0	Protein S100	S100A12		
W5NRC1	Protein S100	S100A16		
W5QIV1	Protein S100	S100A11		
W5PX03	Protein XRP2	RP2		
W5NY22	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PCMT1		
W5PVQ2	Protein-tyrosine-phosphatase	PTPRK		
W5QC41	Pyruvate kinase	PKM		
W5PR68	Receptor expression-enhancing protein	REEP6		
W5NR40	Receptor protein-tyrosine kinase	FLT4		
W5QH42	S-adenosylmethionine synthase	MAT2A		
W5PKE6	S-adenosylmethionine synthase	MAT1A		
W5PKT3	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP3CC		
W5PWZ7	Serine/threonine-protein phosphatase	PPEF1		
W5P1T4	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP4C		
W5Q7U7	Serine/threonine-protein phosphatase	N/A		

W5PG83	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PPP2R4		
W5PEY3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	ATP1A4		
W5P945	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta	ATP1B3		
W5QGQ1	Solute carrier organic anion transporter family member	SLCO1A2		
W5QIT0	Sorbitol dehydrogenase	SORD		
W5PLM3	Sperm surface protein Sp17	SPA17		
W5PLK2	Stathmin	STMN3		
W5QFN4	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	LOC101120376		
W5Q9K1	Sulfhydryl oxidase	QSOX1		
W5P340	Superoxide dismutase	SOD2		
W5PQ18	Synaptogyrin	SYNGR4		
W5QH64	Synaptosomal-associated protein	SNAP23		
W5P375	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1		
W5QFZ3	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4		
W5P765	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3		
W5PFL8	Tetraspanin	CD9		
W5PYR6	Tetraspanin	TSPAN8		
W5P7X3	Transaldolase	TALDO1		
W5Q743	Transporter	LOC101119236		
W5P5W9	Triosephosphate isomerase	TPI1		
W5PZG6	Tyrosine-protein kinase	LYN		
W5PGD2	Tyrosine-protein kinase receptor	ROS1		
W5PIL6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	UCHL5		
W5Q922	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	LOC101105383		
W5P621	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP7		
W5NZZ3	V-type proton ATPase subunit F	ATP6V1F		
W5P303	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB		
W5QBD7	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ		
W5PFR8	Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP1		

ANEXO J – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE COELHOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2
-----------------------------	------------------	---------------	----	----

P83468	14 kDa phosphohistidine phosphatase	PHPT1		
G1SZD6	14-3-3 protein theta	YWHAQ		
G1U723	3alpha/17beta/20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	PGER5		
G1U1X6	5-nucleotidase	NT5C3A		
G1T7Z0	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD		
P50757	72 kDa type IV collagenase	MMP2		
P48038	Acrosin	ACR		
P68135	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1		
P29751	Actin, cytoplasmic 1	ACTB		
G1SMY7	Acylamino-acid-releasing enzyme	APEH		
Q8WN94	Acyl-CoA-binding protein	DBI		
G1SYS6	Acylphosphatase	ACYP1		
P00820	Acylphosphatase-2	ACYP2		
G1SVH0	Adenosylhomocysteinase	AHCY		
G1T432	Adenylyl cyclase-associated protein	CAP1		
O19053	Alcohol dehydrogenase class-3	ADH5		
G1T6I0	Aldehyde oxidase 1	AOX1		
P80456	Aldehyde oxidase 1	AOX1		
G1SQS1	Aldose 1-epimerase	GALM		
P15122	Aldose reductase	AKR1B1		
G1SLU6	Alkaline phosphatase	ALPL		
U3KMU3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	PYGM		
G1SIB9	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	PYGB		
P25227	Alpha-1-acid glycoprotein	ORM1		
Q28665	Alpha-1-antiproteinase E	LOC100008986		
P23035	Alpha-1-antiproteinase F	N/A		
G1SYM4	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG		
U3KMR2	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG		
Q45GR2	Alpha-2-plasmin inhibitor	SERPINF2		
G1SJN5	Alpha-mannosidase	MAN2A1		
G1T8S8	Alpha-mannosidase	LOC100346772		
G1SZM2	Amyloid beta A4 protein	APP		
G1ST58	Anamorsin	CIAPIN1		
G1TYT4	Angiotensin-converting enzyme	ACE		
G1T3I9	Annexin	ANXA7		
G1TA83	Annexin	ANXA4		
G1TIS5	Annexin	ANXA1		
G1TEM7	Annexin	ANXA3		
G1SNT8	Annexin	ANXA6		

G1SL62	Annexin	ANXA2		
G1TED6	Annexin	ANXA5		
P51662	Annexin A1	ANXA1		
P33477	Annexin A11	ANXA11		
G1SL02	AP complex subunit beta	AP2B1		
P09809	Apolipoprotein A-I	APOA1		
G1TVU0	Aquaporin-2	AQP2		
G1T332	Aspartate aminotransferase	GOT1		
G1T4Z2	ATP-citrate synthase	ACLY		
G1T0H8	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	PFKP		
Q28740	Basigin	BSG		
P01885	Beta-2-microglobulin	B2M		
G1SL41	Beta-glucuronidase	GUSB		
G1SWR0	Beta-hexosaminidase	HEXA		
G1SK48	Bleomycin hydrolase	BLMH		
P62160	Calmodulin	CALM		
G1SJ23	Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1		
P15253	Calreticulin	CALR		
Q6XLQ7	Calumenin	CALU		
P00919	Carbonic anhydrase 2	CA2		
G1SRM0	Carboxylic ester hydrolase	CES5A		
P33674	Casein kinase II subunit alpha	CSNK2A1		
G1T6W7	Catalase	CAT		
Q59I72	Catenin alpha-1	CTNNA1		
G1TA99	Cation-transporting ATPase	ATP13A4		
B6V9S9	Chaperonin-containing T-complex polypeptide beta subunit	CCT2		
G1TPL4	Chloride anion exchanger	SLC26A3		
G1SJ77	Chloride intracellular channel protein	CLIC4		
Q95MF9	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1		
G1TBL6	Clathrin heavy chain	CLTC		
Q9XSC5	Clusterin	CLU		
G1T7I4	Coatomer subunit alpha	COPA		
G1STJ4	Complement C3 alpha chain	C3		
P48747	Complement component C9	C9		
O97862	Cystatin-C	CST3		
P00008	Cytochrome c	CYCS		
P08682	Cytochrome P450 2E1	CYP2E1		
Q01059	Cytoplasmic aconitate hydratase	ACO1		
G1U6B2	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	ALAD		

G1SUK5	Density-regulated protein	DENR		
G1T5D5	Dipeptidase	DPEP2		
Q28660	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2	ADAM2		
G1T0D8	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	DTD1		
P63169	Dynein light chain 1, cytoplasmic	DYNLL1		
Q28685	Dystroglycan	DAG1		
P68105	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1		
P34826	Elongation factor 1-beta	EEF1B		
P53787	Elongation factor 1-delta	EEF1D		
P29694	Elongation factor 1-gamma	EEF1G		
O18750	Endoplasmin	HSP90B1		
P29562	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1		
G1TC37	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A2		
P41975	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD3		
G1SKI1	Ezrin	EZR		
G1TKN1	Ferritin	LOC100358983		
G1T6Q8	Ferritin	FTH1		
G1THL2	Ferritin	FTL		
G1TWA7	Fibrinogen alpha chain	FGA		
G1T0W8	Fibrinogen beta chain	FGB		
G1U9R6	Fibronectin	FN1		
G1SE61	Filamin-B	FLNB		
P00637	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1		
Q9N0J6	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	FBP2		
G1T652	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOC		
P00883	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA		
P79226	Fructose-bisphosphate aldolase B	ALDOB		
G1TPZ1	Galectin	LGALS1		
P47845	Galectin-3	LGALS3		
P56201	GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein	H6PD		
B7NZQ6	GDP dissociation inhibitor 1	GDI1		
Q9N1E2	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI		
G1TAC4	Glutaredoxin-1	GLRX		
Q08863	Glutathione S-transferase alpha I	N/A		
P46409	Glutathione S-transferase Mu 1	N/A		
Q08862	Glutathione S-transferase Yc	N/A		
G1SH63	Glutathione synthetase	GSS		
G1TYG1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH		

G1TUD2	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	GNG12		
P19007	Haptoglobin	HP		
P30946	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1		
G1T8Q6	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1		
P01948	Hemoglobin subunit alpha-1/2	N/A		
P02057	Hemoglobin subunit beta-1/2	HBB1		
G1TVS4	Hemopexin	HPX		
O19049	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK		
G1SRI8	Hexokinase	HK1		
G1U754	Histidine-rich glycoprotein	HRG		
G1U155	Histone H2B	HIST1H2BH		
G1TN68	Histone H4	HIST1H4F		
G1T1B3	Hyaluronidase	SPAM1		
A7X8X3	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	HPRT		
P01870	Ig gamma chain C region	N/A		
P01687	Ig kappa chain V region	N/A		
P01685	Ig kappa chain V region 4135	N/A		
P01697	Ig kappa chain V region AH80-5	N/A		
P01840	Ig kappa-b4 chain C region	N/A		
P23108	Immunoglobulin J chain	JCHAIN		
G1SI20	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	IDH1		
G1SS43	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	KATNAL2		
G1TC72	Kinesin-like protein	KIF11		
G1T545	Lactoylglutathione lyase	BTBD9		
P14755	Lambda-crystallin	CRYL1		
G1SP54	Leukotriene A(4) hydrolase	LTA4H		
U3KNF1	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1		
Q9GK62	Lipophilin CP	LOC100008796		
G1TIS1	L-lactate dehydrogenase	LDHC		
G1TYA7	L-lactate dehydrogenase	LDHB		
P13491	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA		
G1TKC4	Lysine--tRNA ligase	KARS		
G1TIH6	Lysozyme	LYZ		
G1TEB7	Lysozyme D1	LOC100356058		
P79227	Macrophage metalloelastase	MMP12		
G1SQG5	Malate dehydrogenase	MDH1		
G1T013	Malic enzyme	ME1		
G1SUK4	Mannose-6-phosphate isomerase	MPI		
P20614	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1		

Q9TRZ7	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2		
Q28619	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	SLC9A3R1		
G1U634	Neprilysin	MME		
P08049	Neprilysin	MME		
G1SZS0	NIF3-like protein 1	NIF3L1		
G1U8I5	Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP		
G1U9T4	Nucleoside diphosphate kinase	NME2		
G1U7U3	Nucleoside diphosphate kinase	NME1		
G1SJZ4	Obg-like ATPase 1	OLA1		
C0HJA6	Odorant-binding protein 2	N/A		
C0HJA9	Odorant-binding protein 3	N/A		
P31097	Osteopontin	SPP1		
G1TRT6	Oxysterol-binding protein	OSBP		
Q02157	Pancreatic triacylglycerol lipase	PNLIP		
G1TNN8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIB		
G1TXI0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	FKBP11		
Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA		
P62943	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A		
O46638	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	FKBP3		
P27124	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	FKBP4		
Q8MK67	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1		
P00949	Phosphoglucomutase-1	PGM1		
G1T7Z6	Phosphoglycerate kinase	LOC100348124		
G1SNJ9	Phosphoglycerate kinase	PGK2		
G1SZX7	Phosphoinositide phospholipase C	PLCB4		
Q05017	Phospholipase B1, membrane-associated	PLB1		
G1TQW3	Phospholipid-transporting ATPase	ATP11A		
P10658	Phosphoserine aminotransferase	PSAT1		
G1T8R1	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	RAP1GAP2		
O19048	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1		
G1TUR3	Polyadenylate-binding protein	LOC100340865		
P01832	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR		
G1T0K4	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT7		
G1SWQ5	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT5		
G1SLX4	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1	KCNQ1		

G1SMU8	Prefoldin subunit 4	PFDN4		
G1T7M0	Presenilin	PSEN1		
G1T519	Proteasome subunit alpha type	PSMA4		
G1T2L1	Proteasome subunit alpha type	PSMA2		
G1T9V4	Proteasome subunit alpha type	PSMA6		
G1SWI7	Proteasome subunit alpha type	PSMA8		
G1T4X8	Proteasome subunit beta type	PSMB2		
G1T4Q9	Proteasome subunit beta type	PSMB5		
G1SU71	Proteasome subunit beta type	PSMB1		
G1SHV9	Proteasome subunit beta type	PSMB3		
G1T918	Proteasome subunit beta type	PSMB4		
G1T235	Proteasome subunit beta type	PSMB6		
P21195	Protein disulfide-isomerase	P4HB		
G1SFV1	Protein disulfide-isomerase	PDIA4		
G1SEV2	Protein disulfide-isomerase	PDIA3		
O77791	Protein S100-A12	S100A12		
P30801	Protein S100-A6	S100A6		
P22758	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	TGM1		
G1SDF2	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PCMT1		
Q95MN6	Proteolipid protein 2	PLP2		
P11974	Pyruvate kinase PKM	PKM		
G1SNH7	Quinoid dihydropteridine reductase	QDPR		
P62493	Ras-related protein Rab-11A	RAB11A		
P46629	Ras-related protein Rab-25	RAB25		
Q01971	Ras-related protein Rab-2A	RAB2A		
G1SFU0	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A		
Q8MI17	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1		
G1TCS3	Ribulose-phosphate 3-epimerase	RPE		
G1SWW8	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP1CC		
G1SX32	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP6C		
Q28717	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PPP2R4		
P11084	Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit	PPP4C		
G1TXX6	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	SARS		
P19134	Serotransferrin	TF		
G1U9S2	Serum albumin	ALB		
P15196	Sex hormone-binding globulin	SHBG		
G1TSW1	Small ubiquitin-related modifier	SUMO1		
G1TM59	Small ubiquitin-related modifier	SUMO4		

Q9N0Z6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1		
G1TI27	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	SLC2A3		
G1TCQ0	Solute carrier organic anion transporter family member	SLCO4C1		
Q95209	Sortilin-related receptor	SORL1		
G1SR41	Stathmin	STMN1		
G1SND0	Sulfhydryl oxidase	QSOX1		
P09212	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1		
G1T0E5	Synaptosomal-associated protein	SNAP23		
G1U9S7	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1		
G1U9T8	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4		
G1SCN8	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3		
O77622	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6		
G1SYM3	Tetraspanin	CD9		
P08628	Thioredoxin	TXN		
P34032	Thymosin beta-4	TMSB4		
G1TKE3	Transgelin	TAGLN2		
G1TAH7	Transketolase	TKT		
P43348	Translationally-controlled tumor protein	TPT1		
Q28735	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMED10		
P07489	Transthyretin	TTR		
P00939	Triosephosphate isomerase	TPI1		
Q95212	Tumor protein D52	TPD52		
B7NZM8	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptid	YWHAH		
G1SPV2	Tyrosine-protein kinase	YES1		
G1SYD3	Tyrosine--tRNA ligase	YARS		
P62975	Ubiquitin	N/A		
G1SJW8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP7		
G1SRQ2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	UCHL3		
G1SMJ5	Ubiquitin-fold modifier 1	UFM1		
Q29504	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1		
G1T398	UMP-CMP kinase	CMPK1		
P02779	Uteroglobin	SCGB1A1		
G1T286	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	VPS29		
P53789	Vitamin D-binding protein	GC		

G1SPA2	Zonadhesin	ZAN		
--------	------------	-----	--	--

ANEXO K – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE EQUINOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2
F6W9Z5	26S protease regulatory subunit 8-like protein	PSMC5		
F7D917	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD		
F6YG82	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5		
F7CZ92	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1		
P60708	Actin, cytoplasmic 1	ACTB		
F6WNY7	Acylphosphatase	ACYP1		
F6VIG9	Adenosylhomocysteinase	AHCY		
F6SRP7	Adenylyl cyclase-associated protein	CAP1		
F7CBN0	Alcohol dehydrogenase (NADP+)-like protein	AKR1A1		
F7DPM9	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	FUT8		
F6ZD04	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	PYGB		
F6YTG8	Alpha-mannosidase	MAN2C1		
F6V3X9	Alpha-mannosidase	MAN2B1		
F7CRC0	Amine oxidase [flavin-containing]	N/A		
F7CWC8	Amine oxidase [flavin-containing]	N/A		
F7ATC2	Angiogenin	ANG		
F6W787	Annexin	ANXA6		
F6ZAK1	Annexin	ANXA3		
F7DE06	Annexin	ANXA11		
F6ZI51	Annexin	ANXA2		
F7CL15	Annexin	ANXA5		
Q8HZM6	Annexin A1	ANXA1		
F6S9R7	ANXA4	Annexin		
F7CLY2	AP complex subunit beta	AP1B1		
P08906	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1		
P30441	Beta-2-microglobulin	B2M		
F7CGS0	Beta-galactosidase	LOC100072895		
F6RVL4	Beta-galactosidase	GLB1		

F6T7J1	Beta-hexosaminidase	HEXA	
P80720	Carbohydrate-binding protein AWN	N/A	
F6UN85	Carboxylic ester hydrolase	LOC100147112	
F7C7A8	Carboxylic ester hydrolase	CES5A	
F6PRI5	Carboxylic ester hydrolase	LOC100051065	
F6QJ78	Carboxypeptidase	CTSA	
F7D854	Catalase	CAT	
F7BGX4	Cation-transporting ATPase	ATP13A4	
F7DFE9	Cation-transporting ATPase	ATP13A3	
F6QHY8	Chloride intracellular channel protein	CLIC4	
F6ZHQ5	Chloride intracellular channel protein	CLIC1	
P81908	Cholinesterase	BCHE	
Q29482	Clusterin	CLU	
F6U5X2	COP9 signalosome complex subunit 3-like protein	COPS3	
A8CWP2	Core2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	GCNT1	
O19010	Cysteine-rich secretory protein 3	CRISP3	
P00004	Cytochrome c	CYCS	
F6VCE9	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	ALAD	
Q4AEE3	Deoxyribonuclease-1	DNASE1	
F6UME7	Elongation factor 1-alpha	LOC100050433	
A2Q127	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	
F6ZUJ2	Endoplasmic-like protein	GRP94	
F6V7C1	Enolase 1	ENO1	
F6V7L0	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A2	
F6V8B9	Ferritin	LOC100054781	
Q8MIP0	Ferritin heavy chain	FTH1	
P02791	Ferritin light chain	FTL	
F6RUZ6	Fibrinogen alpha chain	FGA	
F7CN11	Fibronectin	FN1	
F6ZP69	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOC	
F6SX98	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA	
F7A860	Galectin	LGALS3	
F7DYV0	Galectin	LGALS1	
F6ZE54	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	
F6WDY8	Glucosylceramidase	GBA	
F6Z570	Glutathione peroxidase	GPX5	
F6RBE2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDHS	
F6YV40	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	LOC100054877	
F7AMX0	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPD1L	

	[NAD(+)]			
F7B1R7	Glycoprotein hormones alpha chain	CGA		
F6Z1U4	Glyoxalase domain-containing protein 4-like protein	GLOD4		
Q3S4D6	GM2 activator protein	GM2A		
F7BGR9	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	GNG12		
A2Q0Z1	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8		
Q9GKX7	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1		
Q9GKX8	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1		
P01958	Hemoglobin subunit alpha	HBA		
P02062	Hemoglobin subunit beta	HBB		
F7BA85	Hexokinase	HK1		
F6W1T4	Histone H2A	LOC100063021		
F7E1X9	Histone H2B	HIST1H2BD		
F7C964	Histone H3	LOC100059700		
F6V9V9	Histone H4	HIST1H4C		
F6W9B1	Hsc70-interacting protein-like protein	ST13		
F6Z9K2	Hyaluronidase	N/A		
Q6H321	Kallikrein-1E2	KLK1E2		
O77811	Lactotransferrin	LTF		
F6YU15	Latherin	LATH		
F6QUF7	Lipoprotein lipase	LPL		
F6XFQ1	L-lactate dehydrogenase	LDHC		
C6L1J5	L-lactate dehydrogenase	LDHB		
F6W3T1	L-lactate dehydrogenase	LDHA		
F6ZMI7	Lysozyme A	LYZL4		
F6S243	Macrophage migration inhibitory factor	MIF		
Q95182	Major allergen Equ c 1	N/A		
Q866V7	Major prion protein	PRNP		
F7CZS6	Malate dehydrogenase	MDH1		
F6ZRM9	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1		
F7BEE7	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2		
Q8MJV1	Myosin-2	MYH2		
F6YY66	Nucleoside diphosphate kinase	NME1		
F6TU23	Oxysterol-binding protein	OSBP2		
A5YBL8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIB		
F7D1R1	Phosphoglycerate kinase	PGK1		
Q8MIF7	Phosphoglycerate kinase 2	PGK2		
F6Y409	Piwi-like protein	PIWIL1		
P80010	Plasminogen	PLG		
F6TX55	Polypeptide N-	GALNT4		

	acetylgalactosaminyltransferase			
F6W9D9	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT6		
F6T8K4	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT2		
F6UJ33	Profilin	PFN1		
F6YYP6	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS		
F6WZW6	Proteasome subunit alpha type	PSMA1		
F6Q369	Proteasome subunit alpha type	PSMA8		
F6TCI4	Proteasome subunit alpha type	PSMA2		
F6VEA3	Proteasome subunit alpha type	PSMA5		
F7ANR3	Proteasome subunit alpha type	PSMA3		
F6Z688	Proteasome subunit alpha type	PSMA4		
F7BRA4	Proteasome subunit alpha type	PSMA6		
F7CUX8	Proteasome subunit beta type	PSMB7		
F7DF55	Proteasome subunit beta type	PSMB4		
F6W2I4	Proteasome subunit beta type	PSMB6		
F6WX78	Proteasome subunit beta type	PSMB5		
F6YYB1	Proteasome subunit beta type	PSMB1		
F6WL01	Proteasome subunit beta type	PSMB2		
F6TV65	Proteasome subunit beta type	PSMB3		
F7D2I6	Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5		
F7B821	Protein disulfide-isomerase	P4HB		
F6VSN9	Protein disulfide-isomerase	PDIA3		
F6Z230	Protein S100	S100A12		
F7BND9	Protein S100	S100A11		
F6RM82	Protein S100	S100A9		
F6T046	Protein S100	N/A		
F7DNP8	Protein-tyrosine-phosphatase	PTPRF		
F6XLG0	Purine nucleoside phosphorylase	N/A		
F6W3M5	Pyruvate kinase	PKM		
F7AWD2	Ras-related protein Rab-2B-like protein	RAB2B		
F6SSK7	Ras-related protein Rap-1b-like protein	RAP1B		
F7CKH3	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1		
F6TMR0	Ribonuclease A I1	RNASE12		
F6SIZ6	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1-like protein	PRPS1		
F7BM36	Serine/threonine-protein phosphatase	PPEF1		
F7AYW3	Serine/threonine-protein phosphatase	PPP1CC		
F7BZJ8	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PPP2R4		
P35747	Serum albumin	ALB		
F6RQ03	Sodium/potassium-transporting	ATP1A4		

	ATPase subunit alpha			
Q6SJP3	Solute carrier family 16 member 1	SLC16A1		
F6PH25	Sphingomyelin phosphodiesterase	SMPD1		
F6WQ44	Sulfhydryl oxidase	QSOX1		
P00443	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1		
F7AX81	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1		
F6Z6Q7	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4		
F6UH83	T-complex protein 1 subunit epsilon-like protein	CCT5		
F6V3D5	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3		
F7CEQ2	Tetraspanin	CD63		
F6WQJ4	Tetraspanin	CD9		
F7ALV0	Thioredoxin	TXN		
F7BA40	Transaldolase	TALDO1		
F6QXN5	Transgelin	TAGLN2		
F6TZS9	Triosephosphate isomerase	TPI1		
F7C1N1	Tubby-like protein	TULP2		
F7B7L7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP7		
F6ZNY8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like protein	UBE2N		
Q28388	Uterocalin	N/A		

ANEXO L – PROTEÍNAS COM IDENTIDADE CARACTERIZADAS SEM (P1) E COM AFINIDADE À HEPARINA (P2) DO PLASMA SEMINAL DE SUÍNOS. CAIXAS PRETAS INDICAM A PRESENÇA DA PROTEÍNA NO PICO E AS BRANCAS, AUSÊNCIA.

Código de acesso no Uniprot	Nome da proteína	Gene secretor	P1	P2	P3
F1RS36	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5			
P08001	Acrosin	ACR			
Q29016	Acrosin-binding protein	ACRBP			
P12026	Acyl-CoA-binding protein	DBI			
P24540	Acylphosphatase-1	ACYP1			
P80276	Aldose reductase	AKR1B1			
I3LB86	Alkaline phosphatase	ALPL			
F1SN68	Alpha-1-acid glycoprotein	ORM1			
P50447	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1			
F1SC20	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG			
P29700	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG			

F1SEY1	Alpha-mannosidase	LOC100518647			
F1S1G8	Amine oxidase	AOC3			
P15145	Aminopeptidase N	ANPEP			
A5GFT5	Aminopeptidase-like 1	NPEPL1			
F1SJB5	Annexin	ANXA1			
P19620	Annexin A2	ANXA2			
P00503	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1			
Q2HYU2	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	PFKM			
Q07717	Beta-2-microglobulin	B2M			
F1S6C6	Beta-galactosidase	GLB1L3			
Q4FAT7	Beta-glucuronidase	GUSB			
F1SI88	Beta-hexosaminidase	HEXA			
D0G6X8	Beta-hexosaminidase	HEXB			
O02826	Beta-microseminoprotein	MSMB			
A5PF01	B-factor, properdin	BF			
K7GRG6	BPI fold-containing family A member 1	BPIFA1			
P24020	Carbohydrate-binding protein AQN-3	AQN-3			
P26776	Carbohydrate-binding protein AWN	N/A			
F1SC70	Carboxypeptidase	CTSA			
A1E295	Cathepsin B	CTSB			
P00795	Cathepsin D	CTSD			
Q28944	Cathepsin L1	CTSL			
A5GFX7	Cathepsin Z	CTSZ			
Q29549	Clusterin	CLU			
F1SBS4	Complement C3	C3			
P01025	Complement C3	C3			
Q9TUQ3	Complement component C7	C7			
P51779	Complement factor D	CFD			
Q5XLD3	Creatine kinase M-type	CKM			
Q6QAQ1	ctin, cytoplasmic 1	ACTB			
P18104	C-type natriuretic peptide	NPPC			
Q28987	Cystatin-A8	N/A			
I3LCR4	Cystatin-B	CSTB			
F1RU34	Cystatin-B	CST6			
O62855	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNASE2			
Q29243	Dystroglycan	DAG1			
Q0PY11	Elongation factor 1-alpha	EEF1A			
F1RGR4	Ephrin-A1	EFNA1			
O18994	Epididymal secretory glutathione peroxidase	GPX5			
O97763	Epididymal secretory protein E1	NPC2			

Q28949	Epididymis-specific alpha-mannosidase	MAN2B2			
O02772	Fatty acid-binding protein, heart	FABP3			
F1RX37	Fibrinogen beta chain	FGB			
Q9GJV4	Four and a half LIM domains 1 protein, isoform C	fh1C			
P20735	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	GGT1			
P12309	Glutaredoxin-1	GLRX			
P00355	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH			
Q8SPS7	Haptoglobin	HP			
Q5S1U1	Heat shock protein beta-1	HSPB1			
P01965	Hemoglobin subunit alpha	HBA			
F1RII7	Hemoglobin subunit beta	HBB			
P50828	Hemopexin	HPX			
I3LE39	Histone H2B	HIST1H2BD			
P62802	Histone H4	N/A			
F1S325	Hydroxypyruvate isomerase	HYI			
P01846	Ig lambda chain C region	N/A			
Q29545	Inhibitor of carbonic anhydrase	ICA			
I3LTC6	Inositol monophosphatase 1	IMPA1			
Q28985	Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP5			
P79263	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4			
F1SH92	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4			
Q8WNW3	Junction plakoglobin	Jup			
Q6YT39	Lactotransferrin	LTF			
I3LDM7	Lactoylglutathione lyase	GLO1			
F2Z5B1	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1			
P53715	Lipocalin-1	LCN1			
P00339	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA			
P00336	L-lactate dehydrogenase B	LDHB			
Q5PSB2	Major prion protein	Prp			
P35495	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	PSP-I			
P35496	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	PSP-II			
I3LBY9	Malate dehydrogenase	MDH1			
F1RT17	N(4)-(Beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase	AGA			
B8XH67	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF	SLC9A3R1			
Q8WNQ7	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	GALNS			
Q2VTP6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	LOC654323			
F1S0A2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	LOC100737887			
C4TP28	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4	pebp4			

Q6RI85	Phosphoglycerate kinase 2	PGK2			
B5KJG2	Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2			
P06867	Plasminogen	PLG			
F1SEY8	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR			
I3LK37	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	GALNT7			
I3LFE0	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	LOC100621801			
Q1RLJ4	Prepro-beta-defensin 129 protein	LOC100518995			
O46427	Pro-cathepsin H	CTSH			
Q29095	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS			
P32195	Protegrin-2	NPG2			
C3S7K5	Protein S100	S100A8			
P80310	Protein S100-A12	S100A12			
Q7M329	Ribonuclease T2	RNASET2			
F1SU97	Saposin-B-Val	PSAP			
P09571	Serotransferrin	TF			
F1RUN2	Serum albumin	ALB			
Q4R0H3	Spermadhesin AQN-1	AQN-1			
I3LUD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD3			
P04178	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1			
P82460	Thioredoxin	TXN			
P01224	Thyrotropin subunit beta	TSHB			
C0JPM4	Tissue inhibitor of metalloproteases-2	TIMP-2			
I3L8Y6	Transcobalamin-1	TCN1			
P50390	Transthyretin	TTR			
D0G7F6	Triosephosphate isomerase	TPI1			
Q6QA25	Tropomyosin 3	TPM3			
Q767L7	Tubulin beta chain	TUBB			
P63053	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52			
P26234	Vinculin	VCL			

ANEXO M – DECLARAÇÃO DE REVISÃO ORTOGRÁFICA

Declaro, para devidos fins e fazer prova junto à coordenação do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), que realizei a revisão da tese intitulada "ESTRATÉGIAS "ÔMICAS" PARA O ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES DA FERTILIDADE E METABOLOMA DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS", de autoria de Fágner Cavacante Patrocínio dos Santos, consistindo em correção gramatical, coerência e coesão textual de acordo com as normas técnicas vigentes.

Ubajara, 23 de outubro de 2017.



Ana Paula de Sousa Félix Feitosa

Graduada em Letras pela Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)
Professora da Escola Estadual Grijalva Costa em Ubajara/CE

ANEXO N – DECLARAÇÃO DE REVISÃO DE INGLÊS

Declaro, para devidos fins e fazer prova junto à coordenação do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), que realizei a revisão dos resumos em inglês da tese intitulada “ESTRATÉGIAS "ÔMICAS" PARA O ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES DA FERTILIDADE E METABOLOMA DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS”, de autoria de Fágner Cavacante Patrocínio dos Santos, consistindo em correção gramatical, coerência e coesão textual de acordo com as normas técnicas vigentes.

Ubajara, 23 de outubro de 2017.



Ana Paula de Sousa Félix Feitosa

Graduada em Letras pela Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Professora da Escola Estadual Grijalva Costa em Ubajara/CE