



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

SOLANGE DAMASCENO SOUSA

**ANÁLISE PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DOS FLUIDOS DO TRATO
REPRODUTIVO E CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE CARNEIROS MORADA NOVA**

FORTALEZA

2019

SOLANGE DAMASCENO SOUSA

ANÁLISE PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DOS FLUIDOS DO TRATO
REPRODUTIVO E CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE CARNEIROS MORADA NOVA

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. Área de concentração: Produção Animal.

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

Coorientador: Dr. Maurício Fraga van Tilburg

FORTALEZA

2019

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)

- S698a Sousa, Solange Damasceno.
Análise proteômica e metabolômica dos fluidos do trato reprodutivo e células espermáticas de carneiros Morada Nova / Solange Damasceno Sousa. – 2019.
150 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.
Coorientação: Prof. Dr. Maurício Fraga van Tilburg.
1. Eletroforese bidimensional. 2. Glândulas sexuais acessórias. 3. Metabólitos. 4. Plasma seminal. 5. Proteínas. I. Título.

CDD 636.08

SOLANGE DAMASCENO SOUSA

ANÁLISE PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DOS FLUIDOS DO TRATO
REPRODUTIVO E CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE CARNEIROS MORADA NOVA

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. Área de concentração: Produção Animal.

Aprovada em: 22/03/2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Jorge André Matias Martins
Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE)

Profa. Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dr. Fábio Roger Vasconcelos
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

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

Dedico a minha mãe Maria Mendes, a minha tia Socorro e ao meu pai Enoch que são os responsáveis por esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, oportunidades e conquistas.

A toda minha família, especialmente aos meus pais Enoch e Maria, minha irmã Patrícia e minhas tias Socorro, Solange e Tânia. Obrigada pelo incentivo, amor, estímulo, dedicação, investimento, conselhos, apoio e carinho.

Ao meu orientador Arlindo Moura, pela oportunidade e orientação.

Ao meu coorientador Maurício, pelo apoio e empenho para realização deste trabalho.

A todos os amigos e colegas do laboratório, especialmente aos amigos Taciane, Révila, Aderson, Kamila e Bruna. Obrigada pelo companheirismo, diversão, apoio e incentivo.

Aos meus grandes amigos Ana Luiza, Moemia e Fágner, pelas alegrias, conversas, conselhos e apoio.

Ao Prof. Dr. Paolo Marsan e ao Dr. Luigi Lucini pela orientação, acolhimento, suporte e empenho para o desenvolvimento do estudo realizado no decorrer do Doutorado Sanduíche na *Università Cattolica del Sacro Cuore*.

À banca examinadora, pelas correções e apontamentos para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará.

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

RESUMO

O objetivo do estudo foi identificar por meio da proteômica e da metabolômica as moléculas presentes no plasma seminal, fluidos das glândulas sexuais acessórias e epidídimos, e membranas espermáticas de carneiros Morada Nova. No estudo 1 foram coletadas amostras de sêmen de seis carneiros (utilizando-se vagina artificial) para obter o plasma seminal e espermatozoides. Posteriormente, os animais foram vasectomizados e o fluido das glândulas acessórias coletado por vagina artificial. Em seguida, os animais foram abatidos e os epidídimos, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais foram coletados para a recuperação dos fluidos reprodutivos e espermatozoides epididimários. Por meio de eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática foi avaliado o proteoma das secreções obtidas do trato reprodutivo e membranas espermáticas. As proteínas mais abundantes no plasma seminal foram *binder of sperm 1* (BSP1), *binder of sperm 5* (BSP5), bodesina-2 e espermadesina Z13. Proteínas do fluido das glândulas sexuais acessórias que contribuem para a composição do plasma seminal incluem BSPs, bodesinas, 72kDa colagenase tipo IV, *BPI fold-containing family A member 1*, clusterina, proteína semelhante à ribonuclease inativa 9, inibidor da anidrase carbônica isoforma X2 e albumina. O fluido da cauda do epidídimo contribui para o plasma seminal com proteínas específicas como a lipocalina-5-específica do epidídimo, proteína secretora epididimal E1, prostaglandina-H2 D-isomerase e a espermadesina-1. Comparando os mapas 2-D das proteínas de membrana do espermatozoide ejaculado e da cauda do epidídimo, há um aumento na intensidade e número de *spots* nos mapas da membrana do espermatozoide ejaculado. Estas proteínas são oriundas do fluido das glândulas acessórias. Futuras pesquisas sobre as proteínas identificadas em nosso estudo podem contribuir para investigações de marcadores para a qualidade espermática e fertilidade. No estudo 2 cinco carneiros adultos da raça Morada Nova foram vasectomizados e o fluido das glândulas acessórias (FGA) foi coletado por vagina artificial. Metabólitos foram extraídos e identificados por GC/MS e LC/MS. Os metabólitos obtidos foram analisados pelos bancos de dados *Human Metabolome Database* (HMDB), PubChem e *LIPID Metabolites and Pathways Strategy*. A análise das vias foi realizada utilizando o MetaboAnalyst 3.0. O uso combinado de GC e LC/MS permitiu a identificação de 371 compostos do FGA de carneiros. Estas técnicas apresentaram uma sobreposição de um único metabólito, confirmando a complementaridade das abordagens utilizadas. Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios foi a classe mais abundantes no FGA de carneiros, seguida por aminoácidos ácidos, peptídeos e análogos. Os metabólitos mais

abundantes foram frutose, glicerol, ácido cítrico, D-manitol, D-glicose e ácido L-(+)-lático. Metabólitos identificados no FGA de carneiros estavam envolvidos em 52 diferentes vias. Os metabólitos do FGA atuam como moduladores da função espermática, portanto, a análise química do fluido das glândulas sexuais acessórias é valiosa para melhor entender a reprodução animal bem como para a investigação de biomarcadores da fertilidade.

Palavras-chave: Eletroforese bidimensional. Glândulas sexuais acessórias. Metabólitos. Plasma seminal. Proteínas.

ABSTRACT

The objective of the present study was to identify and characterize, through omics technologies (proteomics and metabolomics), the components present in the secretions of the genital tract and sperm cells of Morada Nova rams. In study 1, Fresh semen samples were collected from six adult rams (using an artificial vagina) and then obtained whole seminal plasma and ejaculated sperm. After, rams were vasectomized and fluid of accessory sex glands was collected (also using an artificial vagina). Next, animals were slaughtered and the epididymides, seminal vesicles and bulbourethral glands were properly collected for recovery of reproductive fluids and epididymal sperm. Two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and bioinformatics tools were used to map the major proteome of secretions from reproductive tract and sperm membranes. The most abundant proteins in the seminal plasma gels appeared as binder of sperm 1 (BSP1), binder of sperm 5 (BSP5), bodhesin-2 and spermadhesin Z13-like. Proteins from composite accessory sex gland fluid that contribute to seminal plasma composition include BSPs, bodhesins, 72kDa type IV collagenase, BPI fold-containing family A member 1, clusterin, inactive ribonuclease-like protein 9, inhibitor of carbonic anhydrase-like isoform X2 and albumin. Cauda epididymal fluid contributes to seminal plasma with specific proteins, such as epididymal-specific lipocalin-5-like isoform X1 and epididymal secretory protein E1, prostaglandin-H2 D-isomerase and spermadhesin-1-like. Comparing 2-D maps of membrane proteins from ejaculated and cauda epididymal sperm membranes, there is an increase in the intensity and number of spots in the ejaculated sperm maps. Those proteins are originated from accessory sex gland fluids. Further research into the proteins identified in our study can contribute to investigations of markers for sperm quality and fertility. In the study 2, five adult Morada Nova rams were vasectomized and accessory sex gland fluid (AGF) was collected by artificial vagina. Metabolites were extracted and identified by GC/MS and LC/MS. Metabolites obtained were analyzed by Human Metabolome Database (HMDB), PubChem, and LIPID Metabolites and Pathways Strategy databases. Pathway analysis was performed using MetaboAnalyst 3.0. Combined use of GC and LC/MS allowed the identification of 371 compounds from AGF of rams. These techniques presented an overlap of one single metabolite, thus confirming the complementarity of the approaches used. Lipids and lipid-like molecules were the most abundant classes in the ram AGF, followed by amino acids, peptides, and analogues. The most abundant metabolites were fructose, glycerol, citric acid, D-mannitol, D-glucose and L-(+)-lactic acid. Metabolites identified in the ram AGF were involved in 52 different pathways.

AGF metabolites are modulators of sperm function, thus chemical analysis of the accessory sex gland fluid is valuable to better understand animal reproduction and to search for biomarkers of fertility.

Keywords: Two-dimensional electrophoresis. Accessory sex gland. Metabolites. Seminal plasma. Proteins.

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
2	CAPÍTULO I: MAPEAMENTO DO PROTEOMA DOS FLUIDOS DO TRATO REPRODUTIVO E MEMBRANAS ESPERMÁTICAS DE CARNEIROS: DO EPIDÍDIMO À EJACULAÇÃO	16
2.1	Introdução	18
2.2	Material e métodos	19
2.2.1	<i>Desenho experimental</i>	19
2.2.2	<i>Animais</i>	20
2.2.3	<i>Coleta do sêmen fresco</i>	20
2.2.4	<i>Vasectomia dos carneiros e coleta do fluido das glândulas acessórias</i>	22
2.2.5	<i>Abate dos carneiros e coleta dos epidídimos, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais</i>	22
2.2.6	<i>Preparação das frações enriquecidas com proteínas da membrana dos espermatozoides</i>	22
2.2.7	<i>Proteínas do plasma seminal e fluidos das glândulas sexuais acessórias, vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e cauda do epidídimo</i>	23
2.2.8	<i>Eletroforese bidimensional</i>	23
2.2.9	<i>Digitalização e análise dos géis</i>	24
2.2.10	<i>Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-Q-Tof (Electrospray ionization quadrupole-time-of-flight)</i>	24
2.2.11	<i>Ontologia gênica</i>	26
2.3	Resultados	26
2.3.1	<i>Proteínas dos fluidos do trato reprodutivo e membranas espermáticas</i>	26
2.3.2	<i>Ontologia gênica</i>	32
2.4	Discussão	35
2.5	Conclusão	40
3	CAPÍTULO II: PERFIL METABOLÔMICO DO FLUIDO DAS GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS DE CARNEIROS MORADA NOVA	41
3.1	Introdução	43
3.2	Material e métodos	45

3.2.1	<i>Animais e coleta do fluido</i>	45
3.2.2	<i>Extração dos metabólitos</i>	45
3.2.3	<i>Análise por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC/MS)</i>	46
3.2.4	<i>Análise por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (GC/MS)</i>	46
3.2.5	<i>Anotação dos metabólitos e análise das vias</i>	47
3.3	Resultados	47
3.3.1	<i>Metaboloma do fluido das glândulas acessórias</i>	47
3.3.2	<i>Metabólitos identificados por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas</i>	49
3.3.3	<i>Metabólitos identificados por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas</i>	54
3.3.4	<i>Análise das vias metabólicas</i>	61
3.4	Discussão	63
3.4.1	<i>Identificação dos metabólitos por GC e LC/MS</i>	64
3.4.2	<i>Principais classes de metabólitos do fluido das glândulas acessórias</i>	64
3.4.3	<i>Vias metabólicas associadas aos metabólitos do fluido das glândulas acessórias</i>	69
3.5	Conclusão	15
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A – LISTA DE FIGURAS	84
	APÊNDICE B – LISTA DE TABELAS	85
	ANEXO A – TABELA 1. PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	86
	ANEXO B – TABELA 2. PROTEÍNAS DO FLUIDO DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	97
	ANEXO C – Tabela 3. PROTEÍNAS DO FLUIDO DAS GLÂNDULAS VESICULARES DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	107

ANEXO D – TABELA 4. PROTEÍNAS DO FLUIDO DAS GLÂNDULAS BULBOURETRAIAS DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	108
ANEXO E – TABELA 5. PROTEÍNAS DO FLUIDO DA CADA DO EPIDÍDIMO DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	120
ANEXO F – TABELA 6. PROTEÍNAS DA MEMBRANA DO ESPERMATOZOIDE EJACULADO IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	139
ANEXO G – TABELA 7. PROTEÍNAS DA MEMBRANA DO ESPERMATOZOIDE DA CAUDA DO EPIDÍDIMO IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	149

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A seleção de reprodutores possui um grande impacto na eficiência reprodutiva do rebanho, uma vez que os machos são capazes de gerar um maior número de crias em um curto período de tempo. Dentre as avaliações realizadas durante a escolha de reprodutores, a análise do sêmen é um fator chave para seleção de machos aptos à reprodução. Neste contexto, o sêmen tem sido alvo de muitos estudos durante décadas e com o surgimento da espectrometria de massas tem se intensificado as pesquisas com a finalidade de investigar e compreender os constituintes do sêmen para avaliação do potencial reprodutivo das espécies domésticas.

O sêmen compreende uma mistura de células espermáticas e secreções oriundas das glândulas sexuais acessórias, epidídimos e testículos. Estas secreções possuem importância fisiológica como carreadoras dos espermatozoides para o trato genital da fêmea e como moduladoras das funções do gameta masculino. Além disso, as secreções das glândulas sexuais acessórias também possuem efeito no trato reprodutivo da fêmea, fertilidade e desenvolvimento de embriões. Dessa forma, a caracterização das biomoléculas que compõem o sêmen contribui para o entendimento das funções das glândulas reprodutivas e de fatores associados à fertilidade, bem como o aperfeiçoamento de técnicas reprodutivas.

A proteômica e a metabolômica tornaram-se ferramentas valiosas para o estudo do sêmen, ambas permitem a identificação de possíveis moléculas associadas à qualidade espermática e à fertilidade. Em ruminantes, a abordagem proteômica tem sido utilizada substancialmente em estudos descritivos e funcionais sobre o líquido seminal. Os estudos descritivos têm caracterizado o proteoma do plasma seminal de bovinos, caprinos e ovinos. Os estudos funcionais têm identificado alterações na expressão de proteínas associadas à fertilidade, qualidade seminal, mudanças sazonais, temperatura e processo de criopreservação. A metabolômica é uma abordagem que permite a detecção de compostos de baixo peso molecular presentes em células, tecidos e biofluidos. Em humanos a metabolômica tem sido utilizada como ferramenta para o diagnóstico da infertilidade masculina. No entanto, em ruminantes poucos estudos tem sido realizados sobre o metaboloma dos fluidos reprodutivos e células espermáticas.

O estudo sobre os componentes dos fluidos reprodutivos de ovinos que contribuem para a formação do plasma seminal e a interação destas moléculas com as células espermáticas não é tão avançado como em bovinos. Dentre as raças de ovinos, a Morada Nova é uma das principais raças de ovinos deslanados do Nordeste brasileiro, sendo explorada para a produção de carne e pele. Esta raça além de se destacar pela adaptabilidade

às condições do semiárido apresenta boa habilidade materna e bons índices de fertilidade e prolificidade. Considerando a relevância dos ovinos Morada Nova, é essencial o uso de ferramentas que complementem os estudos voltados à análise do seu potencial reprodutivo, bem como a caracterização mais extensa das moléculas que compõem o plasma seminal e células espermáticas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar por meio da proteômica e da metabolômica as moléculas presentes no plasma seminal, fluidos das glândulas sexuais acessórias e epidídimos, e membranas espermáticas de carneiros Morada Nova.

2 CAPÍTULO I: MAPEAMENTO DO PROTEOMA DOS FLUIDOS DO TRATO REPRODUTIVO E MEMBRANAS ESPERMÁTICAS DE CARNEIROS: DO EPIDÍDIMO À EJACULAÇÃO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi mapear o proteoma das membranas dos espermatozoides da cauda do epidídimo e ejaculados, bem como dos fluidos do trato reprodutivo de carneiros Morada Nova. Foram coletadas amostras frescas de sêmen de seis carneiros adultos (utilizando-se vagina artificial) para obter o plasma seminal e espermatozoides. Posteriormente, os animais foram vasectomizados e o fluido das glândulas acessórias coletado por vagina artificial. Em seguida, os animais foram abatidos e os epidídimos, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais foram coletados para a recuperação dos fluidos reprodutivos e espermatozoides epididimários. Por meio de eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática foi avaliado o proteoma das secreções obtidas do trato reprodutivo e membranas espermáticas. Os mapas 2-D do plasma seminal obtiveram uma média de 196 ± 22 spots por gel com 62 spots identificados correspondendo a 24 proteínas diferentes. As proteínas mais abundantes foram *binder of sperm 1* (BSP1), *binder of sperm 5* (BSP5), bodesina-2 e espermedesina Z13. Proteínas do fluido das glândulas sexuais acessórias que contribuem para a composição do plasma seminal incluem BSPs, bodesinas, 72kDa colagenase tipo IV, *BPI fold-containing family A member 1*, clusterina, proteína semelhante à ribonuclease inativa 9, inibidor da anidrase carbônica isoforma X2 e albumina. O fluido da cauda do epidídimo contribui para o plasma seminal com proteínas específicas como a lipocalina-5-específica do epidídimo, proteína secretora epididimal E1, prostaglandina-H2 D-isomerase e a espermedesina-1. Comparando os mapas 2-D das proteínas de membrana do espermatozoide ejaculado e da cauda do epidídimo, há um aumento na intensidade e número de spots nos mapas da membrana do espermatozoide ejaculado. Estas proteínas são oriundas do fluido das glândulas acessórias. Futuras pesquisas sobre as proteínas identificadas em nosso estudo podem contribuir para investigações de marcadores para a qualidade espermática e fertilidade.

Palavras-chave: Espectrometria de massas. Glândulas acessórias. Proteínas. Sêmen.

ABSTRACT

The purpose of this study was to map the major proteome of both cauda epididymal and ejaculated sperm and fluids of the reproductive tract of Morada Nova rams. Fresh semen samples were collected from six adult rams (using an artificial vagina) and then obtained whole seminal plasma and ejaculated sperm. After, rams were vasectomized and fluid of accessory sex glands was collected (also using an artificial vagina). Next, animals were slaughtered and the epididymides, seminal vesicles and bulbourethral glands were properly collected for recovery of reproductive fluids and epididymal sperm. Two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and bioinformatics tools were used to map the major proteome of secretions from reproductive tract and sperm membranes. Two-dimensional gels of seminal plasma presented an average of 196 ± 22 spots per gel with 62 spots identified corresponding to 24 different proteins. The most abundant proteins in the seminal plasma gels appeared as binder of sperm 1 (BSP1), binder of sperm 5 (BSP5), bodhesin-2 and spermadhesin Z13-like. Proteins from composite accessory sex gland fluid that contribute to seminal plasma composition include BSPs, bodhesins, 72kDa type IV collagenase, BPI fold-containing family A member 1, clusterin, inactive ribonuclease-like protein 9, inhibitor of carbonic anhydrase-like isoform X2 and albumin. Cauda epididymal fluid contributes to seminal plasma with specific proteins, such as epididymal-specific lipocalin-5-like isoform X1 and epididymal secretory protein E1, prostaglandin-H2 D-isomerase and spermadhesin-1-like. Comparing 2-D maps of membrane proteins from ejaculated and cauda epididymal sperm membranes, there is an increase in the intensity and number of spots in the ejaculated sperm maps. Those proteins are originated from accessory sex gland fluids. Further research into the proteins identified in our study can contribute to investigations of markers for sperm quality and fertility.

Key words: Mass spectrometry. Accessory glands. Proteins. Semen.

2.1 Introdução

O sêmen é composto pelas células espermáticas suspensas em um fluido denominado plasma seminal. Anteriormente, acreditava-se que o fluido seminal servia apenas para facilitar a sobrevivência e o transporte dos espermatozoides, porém estudos mostram que a exposição dos espermatozoides ao plasma seminal é importante para o sucesso reprodutivo (LÓPEZ-PÉREZ; PÉREZ-CLARIGET, 2012). Durante a ejaculação, os espermatozoides são movidos da cauda do epidídimo e misturados com as secreções das glândulas sexuais acessórias. Posteriormente, o sêmen é transportado através da uretra e depositado no trato genital feminino durante o acasalamento (FLORMAN; DUCIBELLA, 2006). Os espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo adquirem a capacidade de fertilização e motilidade devido às alterações bioquímicas ocorridas durante a maturação (DACHEUX et al., 2003). Evidências experimentais mostram que os espermatozoides do epidídimo são capazes de fertilizar quando depositados diretamente no útero (MONTEIRO et al., 2011), porém em carneiros, a exposição do espermatozoide do epidídimo ao plasma seminal melhora sua capacidade de penetrar no muco cervical, além de apresentar taxas de prenhez semelhantes às obtidas com o espermatozoide ejaculado (RICKARD et al., 2014). Assim, parece claro que a capacidade de fertilização do espermatozoide do epidídimo é aumentada quando estas células são expostas às moléculas do plasma seminal.

O plasma seminal é composto por íons, carboidratos, ácido cítrico, lipídios, proteínas, aminoácidos, entre outros (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). As proteínas desempenham papéis significativos na função espermática. Várias proteínas têm sido detectadas no plasma seminal de humanos e espécies domésticas, e estas estão envolvidas na proteção espermática (ALVAREZ; STOREY, 1983), metabolismo dos espermatozoides (SCHÖNECK et al., 1996), motilidade (HUANG et al., 2002), maturação espermática (DACHEAUX et al., 1998), regulação da resposta imune uterina (ROBERTSON, 2005), capacitação (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002), reação acrossômica (MARQUES et al., 2000), fertilização e desenvolvimento embrionário (MOURA et al., 2005; TÖPFER-PETERSEN et al., 2005; RODRIGUEZ-VILLAMIL et al., 2016).

As proteínas dos espermatozoides desempenham papéis essenciais como adesão celular (HERRERO et al., 2005), sinalização e metabolismo (PURI et al., 2008), regulação celular (LI et al., 2014), motilidade, interação espermatozoide-oócito (PRIMAKOFF et al., 2002) e fertilidade (MIKI et al., 2004). Algumas proteínas do espermatozoide são adicionadas à membrana espermática durante a exposição ao plasma seminal. Na ejaculação, as glândulas

sexuais acessórias fornecem a maior parte do volume e a maioria dos constituintes do sêmen e estes constituintes podem afetar a função e a fisiologia do espermatozoide (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). As glândulas sexuais acessórias de carneiros incluem ampola (dilatação da porção final do ducto deferente), vesículas seminais, próstata (estrutura relativamente pequena ou disseminada) e glândulas bulbouretrais (MAXWELL et al., 2007). As vesículas seminais são as principais contribuintes para o plasma seminal e a principal fonte de proteínas que alteram a superfície espermática (BERGERON et al., 2005). O fluido das glândulas bulbouretrais protege os espermatozoides à medida que eles passam através da uretra durante a ejaculação (PEDRON et al., 1997), e estas glândulas estão associadas à resposta imune nos carneiros (ACOSTA-DIBARRAT et al., 2016). Em conjunto, as secreções das glândulas sexuais acessórias podem afetar eventos associados à função espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário (JUYENA E STELLETTA, 2012). A remoção destas glândulas pode impactar o desenvolvimento embrionário (YING et al., 1998) e diminuir a fertilidade de camundongos (PEITZ; OLDS-CLARKE, 1986). Além disso, Henault et al. (1995) mostraram que a fertilidade dos espermatozoides oriundos de touros de baixa fertilidade foi aumentada quando estas células foram misturadas com o fluido das glândulas sexuais acessórias de touros de alta fertilidade.

O estudo sobre os componentes dos fluidos do trato reprodutivo de ovinos que contribuem para a formação do plasma seminal e a interação destas moléculas com as células espermáticas não é tão avançado como em bovinos. Dentre as raças de ovinos, a Morada Nova é uma raça localmente adaptada de carneiros deslanados do nordeste brasileiro (FACO et al., 2008). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi mapear o proteoma das membranas dos espermatozoides da cauda do epidídimo e ejaculados, bem como dos fluidos do trato reprodutivo de carneiros Morada Nova.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Desenho experimental

O delineamento experimental e a estratégia para a presente investigação estão representados na Figura 1. Resumidamente, na primeira parte do estudo, foram coletadas amostras frescas de sêmen de seis carneiros adultos (utilizando-se vagina artificial) para obter o plasma seminal completo e espermatozoides ejaculados. Posteriormente, todos os carneiros

foram vasectomizados e, após a recuperação completa da cirurgia, o fluido das glândulas sexuais acessórias foi coletado, também por meio de vagina artificial. Em seguida, os animais foram abatidos e os epidídimos, as vesículas seminais e as glândulas bulbouretrais foram adequadamente coletados para a recuperação dos fluidos reprodutivos e espermatozoides epididimários. Eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática foram utilizadas para mapear o principal proteoma das membranas dos espermatozoides epididimários e ejaculados, bem como do plasma seminal, secreção das glândulas sexuais acessórias, fluido da cauda do epidídimo e secreções das vesículas seminais e glândulas bulbouretrais dos carneiros.

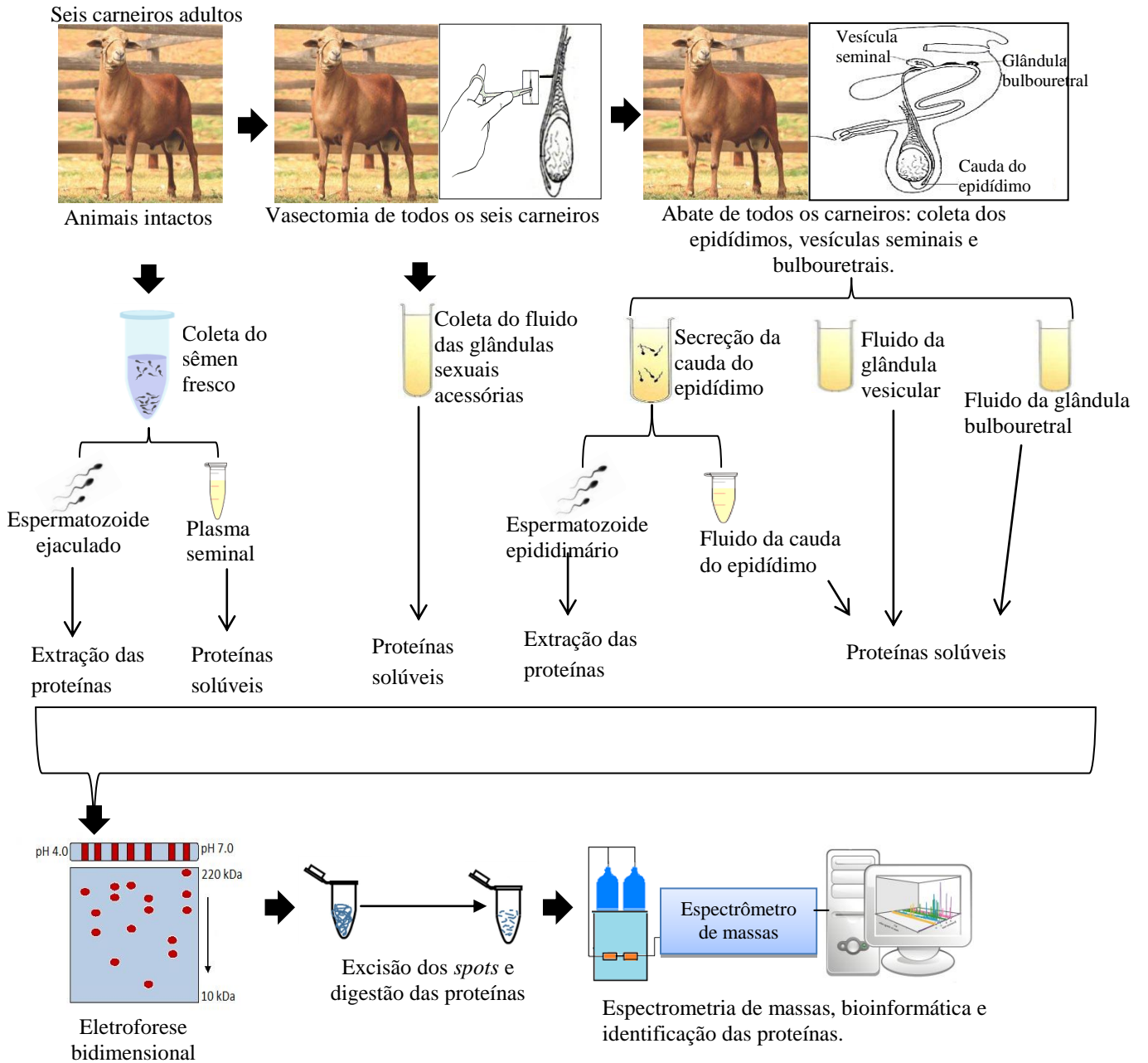
2.2.2 Animais

Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Ceará (CEUA/UFC protocolo 1120270318) e o experimento foi conduzido no Nordeste do Brasil (3° 53' 49.9" Sul e 38° 34' 32.5" Oeste; 69 m acima do nível do mar). Para a presente investigação, foram utilizados seis carneiros adultos e saudáveis da raça Morada Nova, com aproximadamente 1,5 anos de idade e $45,2 \pm 2,34$ kg. Morada Nova é uma raça localmente adaptada de carneiros deslanados do nordeste brasileiro (FACÓ et al., 2008). Durante todo o estudo, os carneiros foram alojados em baias e alimentados com feno de Tifton (*Cynodon dactylon*) e concentrado, seguindo as recomendações do National Research Council (NRC, 2007) para ovinos.

2.2.3 Coleta do sêmen fresco

Na primeira parte do estudo, foi coletado sêmen fresco de todos os carneiros utilizando o modelo de vagina artificial desenvolvido para ovinos (Walmur®, Porto Alegre, RS, Brasil), conforme relatado anteriormente (SOUZA et al., 2012). Imediatamente após a coleta, amostras de sêmen fresco foram centrifugadas ($700 \times g$ por 15 min a 25°C). O sobrenadante resultante (plasma seminal) foi transferido para um tubo limpo, centrifugado novamente ($5000 \times g$ por 1 hora; 4°C) e armazenado a -20°C (SOUZA et al., 2012). O *pellet* (contendo os espermatozoides ejaculados) obtido após a primeira centrifugação foi lavado três vezes ($700 \times g$ por 15 min; 4°C) em tampão PBS (NaCl 137 mM; KCL 15 mM; Na₂HPO₄ 17 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,4) e armazenado a -20°C (VAN TILBURG et al., 2013).

Figura 1 – Delineamento experimental



2.2.4 Vasectomia dos carneiros e coleta do fluido das glândulas sexuais acessórias

Após as coletas das amostras de sêmen fresco, os carneiros foram vasectomizados. A cirurgia foi realizada por um médico veterinário. Os animais foram tranquilizados com xilazina (0,015 mL/kg; Rompun 2,0%; Agrovét Plus, Brasil) por via intramuscular e em seguida foi realizado um bloqueio local com cloridrato de lidocaína (Lidovet, Brasil) para a realização da vasectomia. Após a recuperação completa da cirurgia (quatro semanas), o fluido das glândulas sexuais acessórias foi obtido de todos os carneiros por meio de vagina artificial. O fluido das glândulas acessórias foi centrifugado ($5000 \times g$ durante 30 min; 4°C) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C .

2.2.5 Abate dos carneiros e coleta dos epidídimos, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais

Após a coleta do fluido das glândulas sexuais acessórias, os machos foram abatidos de acordo com as normas do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, 1980; OLIVEIRA et al., 2015), permitindo a coleta dos epidídimos, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais (SOUZA et al., 2012). Todo o epidídimo foi dissecado dos testículos e o fluido da cauda do epidídimo foi obtido por microperfusão com PBS (SOUZA et al., 2012). Os espermatozoides da cauda do epidídimo foram separados do fluido epididimal por centrifugação ($700 \times g$ por 15 min a 4°C), lavados três vezes com tampão PBS, e então os espermatozoides e o fluido foram armazenados a -20°C . Os fluidos das vesículas seminais e bulbouretrais foram coletados por leve massagem e centrifugados a $5000 \times g$ por 30 minutos a 4°C , e armazenados a -20°C . Todas as amostras (fluidos e espermatozoides) receberam 1: 1000 de coquetel inibidor de protease (*protease inhibitor cocktail*, Sigma P8340; Sigma Inc., USA; VAN TILBURG et al., 2013).

2.2.6 Preparação das frações enriquecidas com proteínas da membrana dos espermatozoides

A fração enriquecida com as membranas espermáticas foi obtida como descrito anteriormente por van Tilburg et al. (2013). Em resumo, os espermatozoides da cauda do epidídimo e ejaculados foram descongelados à temperatura ambiente e lavados três vezes com tampão PBS ($700 \times g$ durante 15 min a 4°C). Os espermatozoides foram ressuspensos em 1,5 mL de tampão PBS adicionado de inibidor de protease diluído 1: 1000, e homogeneizados

vigorosamente por meio de um homogeneizador mecânico. Em seguida, as células espermáticas foram novamente lavadas três vezes com tampão PBS ($700 \times g$ durante 15 min a 4°C). O *pellet* rico em membrana foi ressuspensão em 2 mL de tampão PBS e depois foi adicionado Triton X-100 a 1%. As amostras foram mantidas a 4°C durante 2 horas. Decorrido este período, as amostras foram sonicadas durante 30 minutos e depois centrifugadas a $5000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e precipitado em acetona durante 2 horas a -20°C . Depois, as amostras foram centrifugadas ($5000 \times g$ por 1h a 4°C), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi mantido a 4°C *overnight*. O *pellet* foi ressuspensão em 100 μL de tampão de amostra (ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS a 4%, tampão IPG a 2%, DTT 40 mM para 25 mL de H_2O destilada). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.2.7 Proteínas do plasma seminal e fluidos das glândulas sexuais acessórias, vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e cauda do epidídimo

O plasma seminal e os demais fluidos foram descongelados à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em nove partes iguais de acetona e mantidas durante duas horas a -20°C . As amostras foram centrifugadas a $5000 \times g$ durante 1 hora a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* mantido *overnight* a 4°C . O *pellet* foi ressuspensão em 100 μL de tampão de amostra (ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS a 4%, tampão IPG a 2%, DTT 40 mM para 25 mL de H_2O destilada) (van Tilburg et al., 2017). Uma alíquota de cada amostra foi diluída trinta vezes em água destilada para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

2.2.8 Eletroforese bidimensional

Todas as amostras foram separadas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (VAN TILBURG et al., 2017). A focagem isoeletrica, na primeira dimensão, foi realizada utilizando-se tiras de 13 cm com gradiente de pH imobilizado linear de 4 – 7 (IPGs; GE Lifesciences, USA). Quatrocentos microgramas de proteínas foram acrescidos de solução de reidratação com volume final de 450 μL por tira (GE Healthcare). Após 16 horas de reidratação em gel, a focalização isoeletrica foi conduzida em um equipamento ETTANTM IPGphorIITM (GE Lifesciences), com a seguinte programação: 250 V, 500 V, 800 V, 1000 V, 8000 V (9000 Volts hora (Vh)), 8000V (24.000 Vh) totalizando 38.450 Vh. As tiras foram

colocadas em um tampão de equilíbrio (6 M ureia, 75 mM tris-HCl pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol) em duas etapas: primeiro, adicionando-se DTT (100 mg por 10 mL) por 20 minutos e depois trocando-se a solução por iodoacetamida (250 mg por 10 mL) por 20 min. A segunda dimensão foi realizada em géis de poliacrilamida SDS a 12,5% (SE 600 Ruby - Amersham Biosciences) com uma corrente de 20 mA por gel e voltagem máxima de 500 V a 20°C. Todas as amostras foram processadas ao mesmo tempo e processadas com o mesmo lote de reagentes, tampões e equipamentos. As proteínas foram visualizadas por meio do *colloidal Coomassie blue* como previamente descrito por Souza et al. (2012). Depois da eletroforese 2-D, os géis foram lavados três vezes (20 min cada) numa solução contendo ácido fosfórico (2%) e etanol (30%). Posteriormente, três outras lavagens em ácido fosfórico a 2% foram seguidas e os géis foram então imersos por 72 h em solução com ácido fosfórico (2%), etanol (18%) e sulfato de amônio (15%), adicionados com 2mL de solução de *Coomassie blue* G-250 (2%).

2.2.9 Digitalização e análise dos géis

Os géis foram digitalizados utilizando-se o ImageScanner II (GE Lifesciences, USA) na resolução de 300 dpi e modo transparente e filtro verde. As imagens foram salvas como arquivos TIFF (tif) e analisadas através do aplicativo PDQuest versão 8.0.1 (Bio-RadLaboratories, USA). Mapas do plasma seminal, fluido das glândulas sexuais acessórias, fluido da glândula vesicular, fluido das glândulas bulbouretrais, fluido da cauda do epidídimo e membranas dos espermatozoides ejaculadas e epididimários foram avaliados em conjuntos separados. Na análise, cada conjunto continha seis géis. Para cada conjunto, um único gel *master* foi gerado com base em um gel representativo para cada tipo de amostra. As proteínas presentes em regiões distintas dos géis foram empregadas como limites de localização de forma a permitir o alinhamento exato de cada *spot* nos diferentes géis. A quantificação dos spots foi dada em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total de cada gel, fornecida pelo aplicativo (MOURA et al., 2006).

2.2.10 Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-Q-Tof (Electrospray ionization quadrupole-time-of-flight)

As proteínas separadas por eletroforese bidimensional foram digeridas com tripsina segundo metodologia descrita por (MOURA et al., 2006; VAN TILBURG et al.,

2017). Foram recortados 80 spots consistentemente presentes em todos os géis, os quais foram descorados por meio de três lavagens de 15 minutos com solução contendo 400 µL de solução de acetonitrila 50%/ bicarbonato de amônio (25 mM, pH 8,0). Os spots foram desidratados com 200 µL de acetonitrila por 5 minutos e, em seguida, secos completamente no Speed Vac (Concentrator plus, Eppendorf). Foi acrescentada aos spots uma solução de tripsina (20 µg de tripsina (Promega, cat. # V5111, Madison, WI, USA) dissolvidas em 100 µL de ácido acético 50 mM e 900 µL de bicarbonato de amônio 50 mM), após 5 minutos essa foi retirado o excesso desta solução e acrescentou-se 20 µL de bicarbonato de amônio 50 mM às amostras. Estas, por sua vez, foram, então, mantidas em banho-maria a 37°C por, aproximadamente, 18 horas. Posteriormente, os peptídeos foram extraídos por meio de duas lavagens com solução de ácido fórmico 5%/ acetonitrila 50% por 30 minutos. Os peptídeos foram acondicionados em microtubos e secos no Speed Vac.

Os peptídeos oriundos da digestão trípica foram analisados por cromatografia líquida capilar/nanoeletrospray espectrometria de massa em tandem de ionização (NanoUPLC-MS/MS), utilizando um espectrômetro de massa Synapt G1 HDMS (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), conforme descrito anteriormente (SANTOS et al., 2014). Em resumo, os peptídeos (5 µL) foram injetados em solvente A (acetonitrila/água/ácido fórmico, 5/95/0,1) utilizando a bomba auxiliar da unidade de HPLC para interagir com uma coluna Waters Symmetry 300TM (C-18, filme de 5 µm; 0,3 mm × 5 mm) para dessalinização em linha e pré-concentração. Depois da lavagem durante 3 min com solvente A a 5 mL/min, os peptídeos foram então eluídos num gradiente de concentração para a coluna analítica nano ACQUITY HSS T3 (C-18, 5 mm, 0,075 mm x 150 mm). A coluna analítica foi corrida num gradiente (5 a 80% de solvente B; acetonitrila/água/ácido fórmico; 95/5/0,2, em 40 min). O espectrômetro de massa foi calibrado utilizando fragmentos de íons do peptídeo Glu-1-fibrinopeptídeo B (Glu-Fib), conforme necessário para manter a precisão em 10 partes por milhão. O espectrômetro de massas foi operado para obter espectros MS/MS dos peptídeos trípticos em modo dependente de dados (data-dependent acquisition; DDA) para o íon precursor usando o reconhecimento de estado de carga e limite de intensidade como critérios de seleção, através da utilização do aplicativo MassLynx 4.1. De forma a se obter os dados MS/MS, uma varredura (1,5 seg.) foi executada nos dados de relação massa/carga (m/z) entre 400-1500. A partir de cada varredura, até três íons mais intensos, baseando-se nos critérios de seleção foram escolhidos para obtenção da produção dos espectros resultantes da dissociação induzida por colisão (CID) na presença de argônio. Os espectros iônicos resultantes (6-8 seg.) foram processados utilizando o aplicativo Protein Lynx Global Server 2.1 e convertidos em

arquivos de lista de picos (peak list files; PKL) para a pesquisa em banco de dados.

Para a identificação das proteínas foram feitas buscas utilizando os arquivos pkl contra os bancos de dados do NCBIInr, utilizando a ferramenta de busca MASCOT (Matrix Science Inc., Boston, MA, EUA). As buscas foram feitas de acordo com os seguintes critérios: máximo de uma clivagem perdida da tripsina, peptídeos monoisotópicos com carga +1, +2 e +3, com modificação variável de oxidação da metionina e variação fixa de carbamidometilação das cisteínas. Os limites selecionados de tolerância para variação da massa dos peptídeos e dos fragmentos foram de ± 1.2 Da e $\pm 0,6$ Da, respectivamente. A identificação foi considerada não ambígua quando o escore da proteína for significativo ($p < 0,05$), e pela coincidência próxima da massa molecular e pI teóricos e experimentais da proteína.

2.2.11 Ontologia gênica

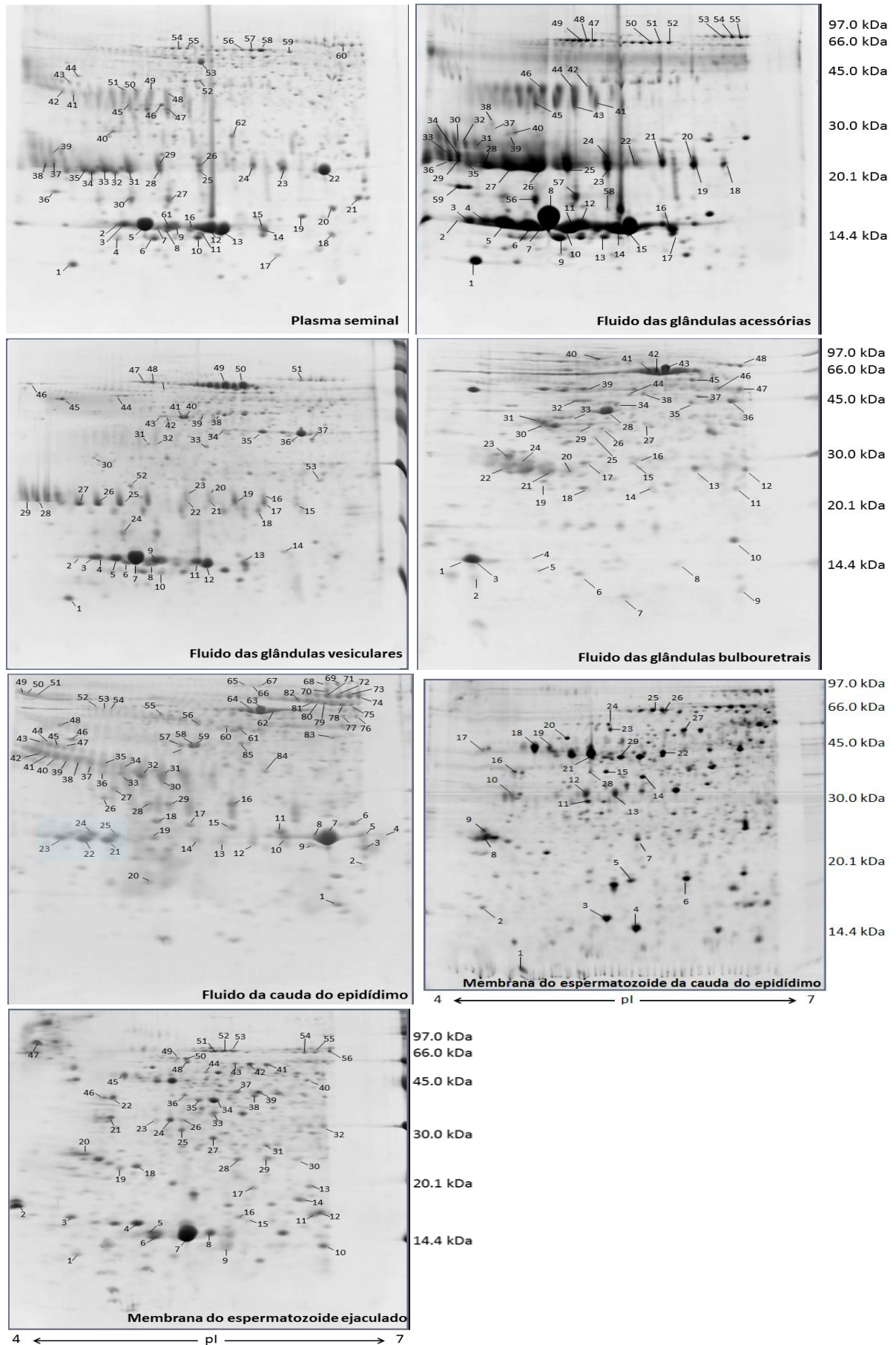
Os dados das proteínas obtidos pelo MASCOT foram analisados utilizando-se o software para pesquisa de anotações de proteínas (STRAP) um aplicativo de código-fonte aberto. Os termos de ontologia gênica (GO) para processos biológicos, localização celular e função molecular foram adquiridos a partir do banco de dados UniProtKB e EBI GOA (REGO et al., 2014).

2.3 Resultados

2.3.1 Proteínas dos fluidos do trato reprodutivo e membranas espermáticas

Os géis bidimensionais do plasma seminal apresentaram uma média de 196 ± 22 spots por gel (Figura 2) e 62 spots foram identificados por espectrometria de massas, correspondendo a 24 proteínas diferentes, equivalentes a 63,2% da intensidade total dos spots detectados nos géis (Tabela 1, anexa). As proteínas mais abundantes nestes géis foram *binder of sperm 1* (BSP1), *binder of sperm 5* (BSP5), bodesina-2 e espermadesina Z13. Dezesete spots correspondem as BSPs e representam 42% da intensidade total dos spots identificados por espectrometria de massas. Em relação às bodesinas, foram detectados 13 spots que apresentaram 23% da intensidade total. Algumas proteínas do plasma seminal identificadas nos géis 2-D estavam presentes como múltiplas isoformas, incluindo albumina e clusterina.

Figura 2 - Mapas bidimensionais dos fluidos do trato reprodutivo e membranas espermáticas de carneiros Morada Nova. Os números dos *spots* referem-se aos mostrados nas tabelas em anexo.



Outros *spots* intensos foram identificados como superóxido dismutase (Cu-Zn), proteína secretora epididimal E1, lipocalina-5 específica do epidídimo, lipocalina e carboxipeptidase Q isoforma X1 (Figura 2; Tabela 1, anexa). Os géis do fluido das glândulas sexuais acessórias apresentaram, em média, 326 ± 92 *spots*, com 52 *spots* correspondentes a 63,4% de todas as intensidades detectadas nos géis e representando 16 proteínas diferentes identificadas por espectrometria de massas (Figura 2; Tabela 2, anexa). BSP1, BSP5, bodesina-2, proteína semelhante à ribonuclease inativa 9 e a espermaesina Z13 representaram o *spots* mais abundantes. Dezoito *spots* corresponderam às BSPs, apresentando 38% da intensidade total de todas as proteínas identificadas.

Foram detectados 313 ± 122 *spots* por gel do fluido da glândula vesicular, onde foram identificados 53 *spots*, correspondendo a 20 proteínas distintas e 32,6% da intensidade total dos *spots* detectados nos géis (Figura 2; Tabela 3, anexa). Neste caso, as moléculas mais abundantes foram bodesina, aldose redutase, proteína semelhante à ribonuclease inativa 9 e BSP5. As bodesinas estavam presentes em 15 *spots*, nove *spots* corresponderam à proteína semelhante à ribonuclease inativa 9 e seis *spots* foram identificados como BSP5. Outros *spots* intensos foram identificados como a espermazina Z-13, aldose redutase, albumina, proteína regulada por glicose de 78 kDa, a calreticulina e actina citoplasmática 1. Os géis bidimensionais do fluido das glândulas bulbouretrais apresentaram uma média de 302 ± 26 *spots* por gel (Figura 2), com a identificação de 48 *spots* correspondentes a 32 proteínas diferentes (Tabela 4, anexa). Em conjunto, estes *spots* representaram 37% das intensidades de todos os *spots* detectados nos géis 2-D. *BPI fold-containing family A member 1*, albumina e beta-microseminoproteína foram os *spots* mais intensos identificados. A *BPI fold-containing family A member 1* representou 10 *spots* os quais corresponderam a 32% da intensidade total dos *spots* identificados por espectrometria de massas. Proteínas adicionais identificadas nos géis do fluido das glândulas bulbouretrais incluem superóxido dismutase, peroxirredoxina, tioredoxina, alfa enolase, imunoglobulina e serotransferrina. Os mapas do fluido da cauda do epidídimo continham uma média de 287 ± 47 *spots* (Figura 2), com a identificação de 85 *spots* correspondentes a 28 proteínas diferentes (Tabela 5, anexa). Combinadas, as intensidades dos *spots* identificados representaram 27% das intensidades de todos os *spots* detectados nos géis. A alfa-2-macroglobulina, beta-galactosidase, clusterina, inibidor de protease de dupla cabeça e lipocalina-5 específica do epidídimo corresponderam aos principais *spots* identificados. A clusterina representou 20 *spots* e a lipocalina-5 específica do epidídimo correspondeu a nove *spots*. A albumina estava presente como múltiplas isoformas, assim como a proteína de ligação à galectina-3, alfa-1-antiproteínase, beta-manosidase,

proteína semelhante à ribonuclease inativa 9 e glutationala peroxidase secretora epididimária.

Os mapas das membranas dos espermatozoides ejaculados e epididimários continham, em média, 244 ± 54 e 234 ± 37 *spots*, respectivamente (Figura 2). De 56 *spots*, equivalentes a 39,7% de todas as intensidades dos *spots* detectados nos mapas 2D, 36 proteínas diferentes foram identificadas nos géis da membrana do espermatozoide ejaculado (Tabela 6, anexa), e dentre as proteínas mais abundantes a BSP1 representou 26% da intensidade total de todas as proteínas identificadas. Outros *spots* intensos corresponderam à proteína 1 associada à membrana acrossomal do espermatozoide, citosol aminopeptidase e ATP-sintase subunidade beta, mitocondrial. Foram identificadas 17 proteínas distintas de 29 *spots* no gel da membrana do espermatozoide epididimário, e estes *spots* representaram 26,5% de todas as intensidades detectadas (Tabela 7, anexa). *Spots* intensos incluem a proteína associada à membrana acrossomal do espermatozoide, a ATP sintase subunidade beta e a succinil-CoA ligase [GDP] subunidade beta. A intensidade da proteína associada à membrana acrossomal do espermatozoide correspondeu a 17% de todos os *spots* identificados. Proteínas adicionais identificadas incluem *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 32*, *succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta*, carboxipeptidase Q, proteína de choque térmico 60kDa, *stress-70 protein, mitochondrial*. Todas as proteínas identificadas nos fluidos do trato reprodutivo e membranas espermáticas de carneiro estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Proteínas dos fluidos do trato reprodutivo e membranas espermáticas de carneiros identificadas por espectrometria de massas (Esi-Q-Tof). A detecção de uma proteína específica de cada amostra é indicada por uma caixa cinza. Plasma seminal (PS), fluido das glândulas acessórias (FGA), fluido das glândulas vesiculares (FGV), fluido das glândulas bulbouretrais (FGB), fluido da cauda do epidídimo (FCE), membrana dos espermatozoides ejaculados (MEJ), membrana dos espermatozoides da cauda do epidídimo (MEP).

Proteína	Fluidos					Espermatozoide	
	PS	FGA	FGV	FGB	FCE	MEJ	MEP
Proteína 14-3-3							
Proteína 14-3-3 epsilon isoforma X2							
3-hidroxiisobutirato desidrogenase, mitocondrial isoforma X1							
3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, mitocondrial isoforma X2							
4-trimetilaminobutiraldeído desidrogenase							
Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial							
Colagenase do tipo IV de 72kDa							
Proteína regulada por glucose de 72kDa							

Proteína de ligação à acrosina isoforma X1							
Fator associado à formação do acrossoma							
Actina							
Actina, beta							
Actina, citoplasmática 1							
Proteína T2 relacionada à actina							
Adenosil-homocisteinase							
Proteína âncora de quinase A 4							
Aldose redutase							
Proteína contendo o domínio da alfa/beta hidrolase 14B							
Alfa-1-antiproteínase							
Alfa-2-macroglobulina isoforma X1							
Alfa-enolase isoforma 1							
Alfa-enolase isoforma X3							
Enzima conversora de angiotensina isoforma X2							
Anexina A4 isoforma X1							
ATP sintase subunidade beta, mitocondrial							
ATP sintase subunidade delta, mitocondrial							
Beta-actina							
Beta-galactosidase isoforma X2							
Betahexosaminidase subunidade beta isoforma X1							
Beta-manosidase							
Beta-microseminoproteína							
Beta-microseminoproteína isoforma X2							
<i>Bind of sperm 1</i>							
<i>Binder of sperm 5</i>							
Bodesina							
Bodesina-2							
<i>BPI fold-containing family A member 1</i>							
Calreticulina							
Carboxipeptidase Q							
Carboxipeptidase Q isoforma X1							
Carboxipeptidase Q isoforma X2							
Proteína ácida da cartilagem 1 isoforma 1							
Proteína ácida da cartilagem 1 isoforma X4							
Clusterina isoforma X1							
Proteína semelhante à coactosina							
Creatina quinase tipo B isoforma X2							
Proteína secretora rica em cisteína 1 isoforma X1							
Subunidade do complexo citocromo b-c1 1, mitocondrial							
Citosol aminopeptidase							
Componente de acetiltransferase de resíduo de di-hidrolipolisina do complexo piruvato desidrogenase, mitocondrial							
Proteína 32 contendo o domínio desintegrina e metaloproteinase							
Proteína 32 contendo o domínio desintegrina e metaloproteinase isoforma X2							
Inibidor de protease de dupla cabeça							
Proteína residente no retículo endoplasmático 29							
Glutationa peroxidase secretória do epidídimo							
Proteína secretora do epidídimo E1							

Lipocalina-5 específica do epidídimo isoforma X1							
Equatorina isoforma X1							
<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i>							
Ferritina							
Ferritina, mitochondrial							
Galectina 1							
Proteína de ligação a galectina-3 isoforma X1							
Proteína de ligação a galectina-3 isoforma X2							
Glutathione transferase M3							
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial isoform X1							
Guanidinoacetato N-metiltransferase							
Proteína de choque térmico de 70 kDa 1-like							
Imunoglobulina gama Fc receptor I de alta afinidade							
Imunoglobulina alfa							
Proteína semelhante à ribonuclease inativa 9							
Inibidor da anidrase carbônica isoforma X1							
Inibidor da anidrase carbônica isoforma X2							
Lipocalina							
Lipocalina-15 isoforma X2							
Isoforma proteica tipo lipocalina 1 X3							
Mamaglobina-A							
Desidrogenase acil-CoA específica de cadeia média, mitochondrial							
Inibidor de metaloproteinase 2							
Complexo MICOS subunidade Mic60 isoforma X3							
Cadeia leve reguladora da miosina 2, isoforma do músculo cardíaco / ventricular							
Subunidade NADH desidrogenase 24 kDa (AA 6-217)							
Peroxiredoxina-2							
Peroxiredoxina-5, mitochondrial							
Peroxiredoxina-6							
Fosfoglicolato fosfatase							
Alfa-L-fucosidase plasmática							
Prostaglandina-H2 D-isomerase							
Proteína dissulfeto-isomerase A3							
Proteína dissulfeto-isomerase A6 isoforma 2							
Proteína dissulfeto-isomerase isoforma X1							
Proteína homóloga LEG1							
Proteína S100-A11							
Proteína homóloga SEC13							
Pyruvato desidrogenase E1 componente subunidade beta, mitochondrial isoforma 1							
Pyruvato desidrogenase E1 componente subunidade beta, mitochondrial isoforma X1							
Beta inibidor de dissociação do GDP de Rab							
Reticulocalbina-1 isoforma X1							
Retinal desidrogenase 1							
Roporina-1							
Isoforma alfa da subunidade catalítica serina / treonina-fosfatase proteica 2 ^a							
Serotransferrina							
Albumina							
Globulina de ligação a hormônios sexuais							

isoforma X1							
Ácido siálico sintase							
Proteína associada à membrana do acrossomo do espermatozoide 1							
Proteína associada à membrana do acrossomo do espermatozoide 3							
Espermadesina Z13 isoforma X1							
Espermadesina Z13 isoforma X2							
Espermadesina-1							
Sintase de espermidina							
Sintase de espermidina-like							
Proteína Stress-70, mitocondrial							
Proteína Stress-70, mitocondrial isoforma X1							
Subunidade da flavoproteína succinato desidrogenase [ubiquinona], mitocondrial							
Subunidade da flavoproteína succinato desidrogenase [ubiquinona], mitocondrial isoforma X2							
Subunidade beta da succinil-CoA ligase [formadora de ADP], mitocondrial							
Subunidade beta da succinil-CoA ligase [formadora de GDP], mitocondrial							
Superóxido dismutase [Cu-Zn]							
<i>Testis-expressed sequence 101 protein</i>							
Tiorredoxina							
Proteína 17 contendo domínio da tiorredoxina							
Proteína 5 contendo domínio da tiorredoxina							
Retículo endoplasmático transicional ATPase							
Transtirretina							
Enzima trifuncional subunidade alfa, mitocondrial							
Isoforma da cadeia beta-3 da tubulina							
Isoforma de cadeia de tubulina beta-4A X1							
Tubulina cadeia beta-7							
Proteína de grânulos Zymogen 16 homólogo B-like							

2.3.2 Ontologia gênica

Com base na análise da GO, os processos biológicos mais frequentes ligados ao plasma seminal, fluido das glândulas acessórias, fluido das glândulas bulbouretrais, fluido das glândulas vesiculares, fluido da cauda do epidídimo, e membranas dos espermatozoides ejaculados e epididimários foram regulação e processo celular. A categoria componente celular das proteínas de todos os fluidos foi definida principalmente como extracelular. Nas membranas dos espermatozoides ejaculados e epididimários, de acordo com sua localização celular, a maioria das proteínas identificadas estava associada à mitocôndria. As funções moleculares mais comuns para todas as proteínas dos fluidos reprodutivos e das membranas espermáticas foram atividade de ligação e atividade catalítica (Figura 3 e 4).

Figura 3 - Gráficos da ontologia gênica do proteoma dos fluidos do trato reprodutivo de carneiros com base nos processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares.

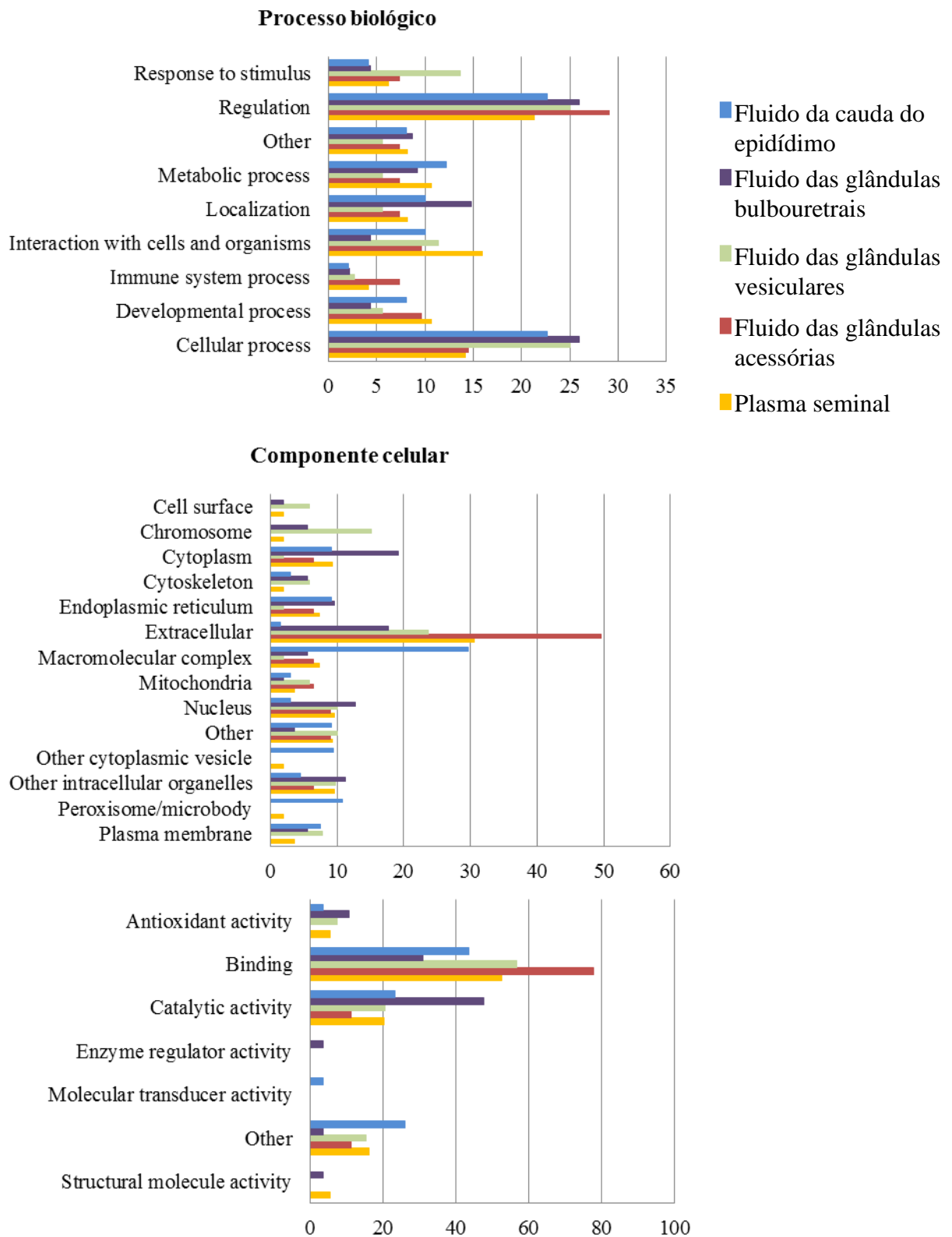
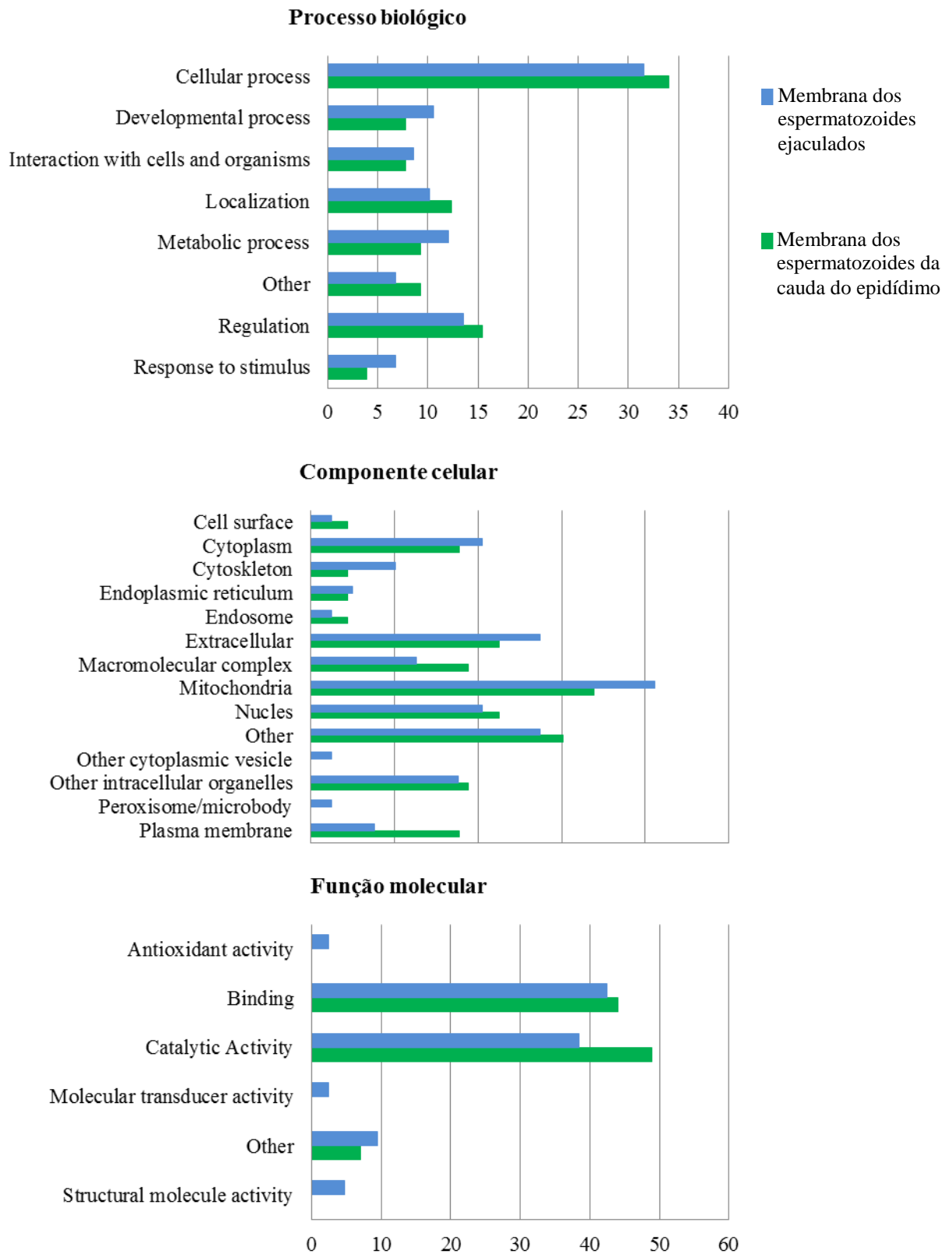


Figura 4 - Gráficos da ontologia gênica do proteoma das membranas espermáticas de carneiros com base nos processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares.



2.4 Discussão

Por meio de uma abordagem proteômica clássica baseada em eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, o presente estudo descreveu o perfil proteico dos fluidos do trato reprodutivo (epidídimos, glândulas sexuais acessórias e plasma seminal) de carneiros Morada Nova, bem como as principais proteínas das membranas dos espermatozoides ejaculados e da cauda do epidídimo (Figura 5 e 6). Esta abordagem permitiu a identificação de 130 proteínas diferentes e a caracterização das principais moléculas que contribuem para formar as proteínas do plasma seminal e da superfície dos espermatozoides de carneiro.

Figura 5 - Contribuição do proteoma principal dos fluidos do trato reprodutivo para a composição do plasma seminal de carneiros

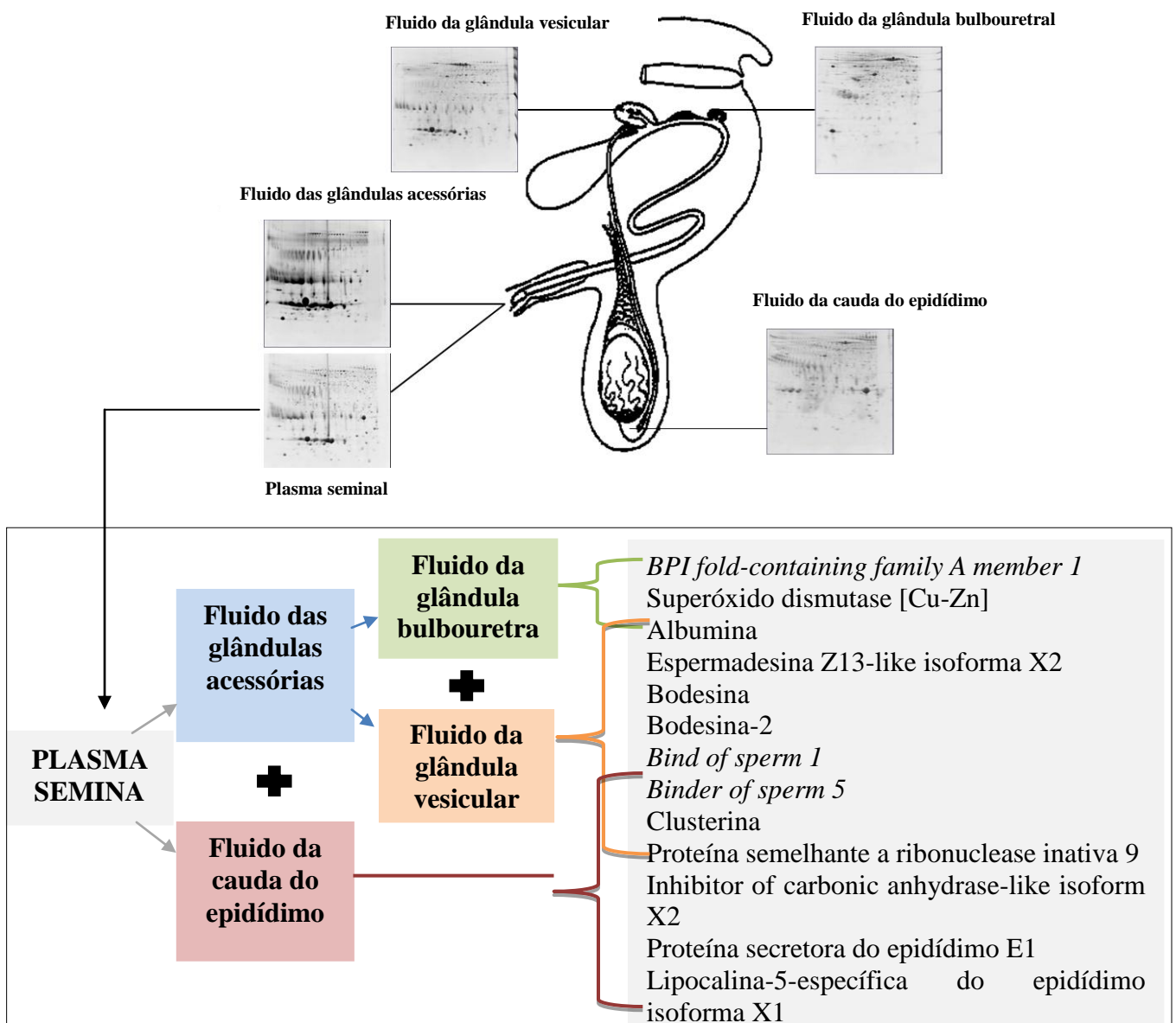
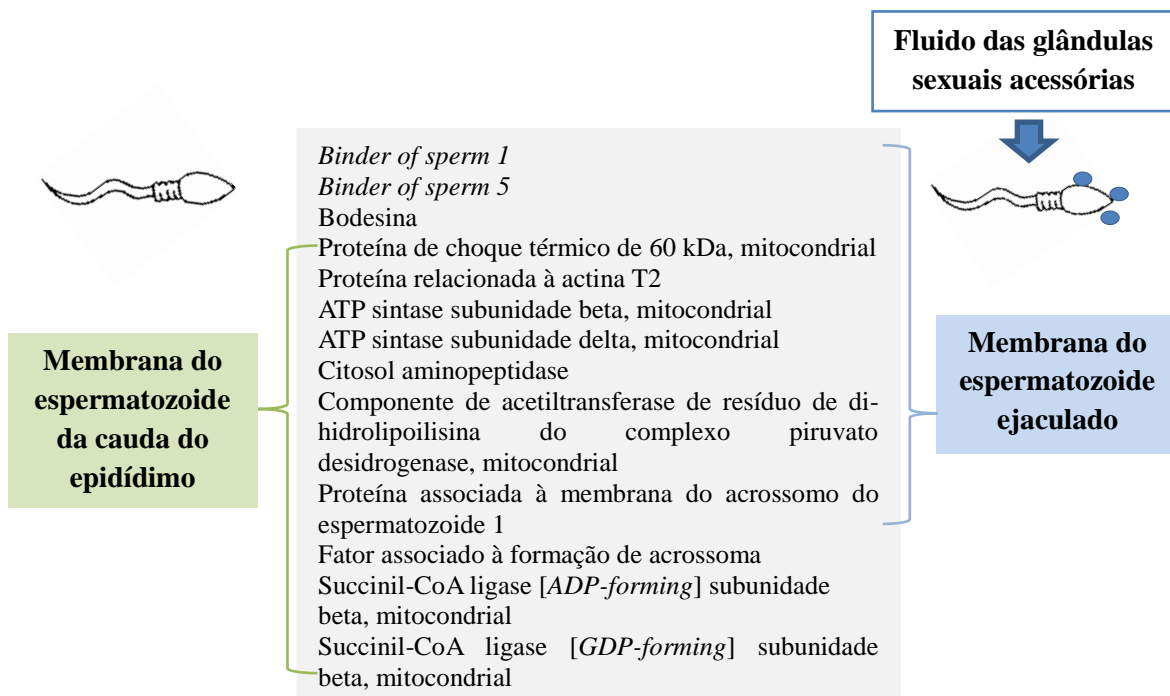


Figura 6. Resumo das proteínas identificadas nas membranas espermáticas de carneiros.



Dos géis 2-D do plasma seminal, 143 *spots* estavam presentes em todos os seis mapas analisados do plasma seminal. Dentre estes, os *spots* mais intensos também estavam presentes nos mapas dos fluidos das glândulas vesiculares e cauda do epidídimo. Os *spots* predominantes no plasma seminal foram identificados como BSPs e bodesinas, juntos, eles representaram 30 *spots* de 62 dos identificados no plasma seminal. Os mapas do fluido das glândulas sexuais acessórias e plasma seminal tiveram uma distribuição de *spots* semelhante. Nestes mapas proteicos os *spots* mais intensos foram identificados como BSPs, bodesinas e espermedesina Z13. Proteínas do fluido das glândulas sexuais acessórias que contribuem para a composição do plasma seminal também incluem 72kDa colagenase tipo IV, *BPI fold-containing family A member 1*, clusterina, proteína semelhante à ribonuclease inativa 9, inibidor da anidrase carbônica isoforma X2 e albumina. BSPs e bodesinas são fornecidas especialmente pelo fluido da glândula vesicular. Durante a ejaculação, estas moléculas se ligam ao espermatozoide do carneiro e atuam na capacitação espermática e interação espermatozoide-oócito (LUNA et al., 2014; TOPFER-PETERSEN et al., 1998), dentre outras funções.

Outras proteínas expressas principalmente no fluido das glândulas vesiculares foram aldose redutase e proteína semelhante à ribonuclease inativa 9. A aldose redutase foi

expressa apenas no fluido da glândula vesicular e as funções fisiológicas associadas a esta molécula nas glândulas vesiculares incluem proteção contra compostos citotóxicos e produção de frutose. A aldose redutase, juntamente com a sorbitol desidrogenase, promove a produção de frutose nas células epiteliais das vesículas seminais de ratos e, em seguida, libera-a no plasma seminal (KOBAYASHI et al., 2002). A frutose pode ser usada pelos espermatozoides para a glicólise e produção de energia necessária para a motilidade. A proteína semelhante à ribonuclease inativa 9, também expressa no plasma seminal, é um membro da família RNase e apresenta atividade antibacteriana, portanto essa proteína pode proteger as células espermáticas contra o ataque bacteriano nos tratos genitais masculino e feminino (CHENG et al., 2009). Mapas do fluido das glândulas bulbouretrais apresentaram um *cluster* proteico identificado como *BPI fold-containing Family A member 1*, que também é expressa no plasma seminal. A proteína bactericida de alta permeabilidade (BPI) é uma molécula antibiótica endógena que apresenta efeito citotóxico sobre as bactérias gram-negativas (CIONERI et al., 2002). Esta proteína pode contribuir para os efeitos antimicrobianos do sêmen de carneiro. A glândula bulbouretral também fornece albumina e superóxido dismutase [Cu-Zn] ao plasma seminal. Estas moléculas atuam na defesa antioxidante (ARMSTRONG et al., 1998), assim elas podem contribuir para a viabilidade dos espermatozoides de carneiro, eliminando os radicais livres gerados pelo estresse oxidativo. A microseminoproteína beta foi identificada apenas nos géis 2-D do fluido das glândulas bulbouretrais e foi um dos *spots* mais intensos. Esta proteína está associada à atividade antimicrobiana e modulação imunológica (OHKUBO et al., 1995).

O fluido da cauda do epidídimo contribui para a composição do plasma seminal com proteínas específicas de baixa massa molecular, como a lipocalina-5-específica do epidídimo, proteína secretora epididimal E1, prostaglandina-H2 D-isomerase e a espermedesina-1. A lipocalina-5-específica do epidídimo pertence à superfamília lipocalina, que é responsável pelo armazenamento e transporte de pequenos compostos, como esteroides, retinoides, lipídios e vitaminas (FLOWER, 1996). A lipocalina-5-específica do epidídimo provavelmente desempenha um papel na maturação ou armazenamento dos espermatozoides devido à sua capacidade de se ligar às moléculas lipofílicas (KELLY et al., 2006; FOUCHÉCOURT et al., 2003). A clusterina foi uma das proteínas abundantes representando 20 *spots* nos géis do fluido da cauda do epidídimo. De fato, a clusterina é uma das principais proteínas do fluido epididimário de carneiros (DACHEUX et al., 2009) e desempenha um papel na proteção e sobrevivência espermática durante o armazenamento na cauda do epidídimo, evitando danos peroxidativos (REYES-MORENO et al., 2002). A clusterina

também estava presente como múltiplas isoformas nos géis 2-D do plasma seminal, portanto o fluido da cauda do epidídimo pode ser a principal fonte dessa proteína para o plasma seminal. Beta-galactosidase e alfa-2-macroglobulina foram outras moléculas abundantes no fluido epididimário. Em ratos, a beta-galactosidase é sintetizada pelo epitélio epididimal e liga-se à superfície espermática durante o trânsito epididimal, não sendo incorporada à membrana plasmática (SOSA et al., 1991). A beta-galactosidase provavelmente pode alterar porções de carboidratos na superfície do espermatozoide (HALL; KILLIAN, 1987). A alfa-2-macroglobulina atua como um inibidor de proteinase e tem sido associada à qualidade do sêmen e à motilidade espermática em humanos (GLANDER et al., 1996). No epidídimo de carneiros esta proteína pode contribuir para a qualidade das células espermáticas e regulação da atividade proteolítica no fluido epididimal.

No epidídimo, a maturação resulta da interação entre o espermatozoide e o fluido epididimal, principalmente com certas moléculas existentes no lúmen do ducto epididimário (DACHEUX et al., 2003). Proteínas específicas identificadas no fluido da cauda do epidídimo como a beta-hexosaminidase e a beta-manosidase podem se ligar ao espermatozoide e modular sua superfície por meio da digestão de proteínas da membrana expondo novos domínios ou incorporando novas glicoproteínas durante a passagem pelos epidídimos (CASTELLON; HUIDOBRO, 2000). As proteínas de ligação espermática do epidídimo também podem evitar interações entre as superfícies dos espermatozoides cobrindo locais que podem ser ativados posteriormente durante a fertilização (DACHEUX et al., 2005).

Comparando os mapas 2-D das proteínas de membrana do espermatozoide ejaculado e da cauda do epidídimo, podemos notar há um aumento na intensidade e número de *spots* de baixa massa molecular nos mapas da membrana do espermatozoide ejaculado. Estas proteínas são oriundas do fluido das glândulas acessórias identificadas como as BSPs e bodesinas. Estas moléculas foram detectadas na membrana do espermatozoide ejaculado, mas não na membrana do espermatozoide da cauda do epidídimo, demonstrando sua interação com os espermatozoides do carneiro após a ejaculação. Além disso, apesar das BSPs e bodesinas terem sido detectadas nos mapas da membrana espermática, elas não fazem parte do espermatozoide. Em vez disso, elas vêm das glândulas sexuais acessórias, como discutido anteriormente, e se ligam ao espermatozoide numa afinidade tão grande que nenhuma das lavagens é capaz de removê-las das células espermáticas (RODRIGUEZ-VILLAMIL et al., 2016). De acordo com Rickard et al. (2014), espermatozoides ejaculados de carneiros são mais capazes de atravessar a cérvix após a inseminação em comparação com os espermatozoides epididimários, e isto está relacionado com as proteínas ligadas à membrana

espermática conferidas pelo plasma seminal. As únicas proteínas ligadas à membrana detectadas em nosso estudo foram BSPs e bodesinas.

As proteínas detectadas nas membranas dos espermatozoides ejaculados e espermatozoides da cauda do epidídimo estão mais associadas à produção de energia, adesão celular e atividade proteolítica. A ATP sintase subunidade beta e a ATP sintase subunidade delta foram encontradas em abundância nos espermatozoides ejaculados e da cauda do epidídimo. Ambas as moléculas são componentes do complexo ATP sintase dos espermatozoides e estão envolvidas na síntese de ATP (DEVENISH et al., 2008). O ATP intracelular é a principal fonte de energia dos espermatozoides e funciona como um motor molecular para o movimento flagelar que é necessário para o espermatozoide atingir o óvulo e realizar a fertilização (COSSON, 2012). A succinil-CoA ligase [GDP-*forming*] subunidade beta, um *spot* muito intenso encontrado apenas na membrana do espermatozoide da cauda do epidídimo, desempenha um papel no ciclo do ácido cítrico (JOHNSON et al., 1998) e também pode contribuir na geração de ATP fornecendo energia para espermatozoides.

Outras proteínas identificadas tanto na membrana do espermatozoide ejaculado quanto na membrana do espermatozoide da cauda do epidídimo incluem proteína associada à membrana acrossômica, citosol aminopeptidase e isoformas da *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 32*. A proteína associada à membrana acrossômica dos espermatozoides é um receptor glicoproteico localizado no segmento equatorial dos espermatozoides e participa de atividades proteolíticas ou adesivas. Assim, esta molécula pode estar envolvida na adesão e fusão espermatozoide-oócito (LIAO et al., 2009). A citosol aminopeptidase, abundantemente expressa tanto na membrana do espermatozoide ejaculado quanto na membrana do espermatozoide da cauda do epidídimo, está associada ao processamento e renovação de proteínas intracelulares e parece ser importante na preservação da viabilidade celular (RAPULING, 2010). A citosol aminopeptidase pode contribuir para a viabilidade dos espermatozoides de carneiros. *Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 32* pertence à família desintegrina e metaloproteinase (ADAM) e pode atuar como uma molécula de adesão celular mediando a ligação espermatozoide-oócito (EVANS et al., 1999).

2.5 Conclusão

Em conjunto, nossos resultados sugerem que diferentes regiões do trato reprodutivo contribuem com diferentes proteínas para o plasma seminal, e que estas proteínas alteram o padrão de proteínas da membrana do espermatozoide após a ejaculação. Futuras pesquisas sobre as proteínas identificadas em nosso estudo podem contribuir para investigações de marcadores proteicos para a qualidade espermática, diagnóstico de distúrbios do trato reprodutivo e fertilidade, contribuindo para a melhoria do uso de biotecnologias reprodutivas em ovinos.

3 CAPÍTULO II: PERFIL METABOLÔMICO DO FLUIDO DAS GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS DE CARNEIROS MORADA NOVA

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar o metaboloma do fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova utilizando duas técnicas complementares a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) e cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC/MS). Cinco carneiros adultos da raça Morada Nova foram vasectomizados e o fluido das glândulas acessórias (FGA) foi coletado por vagina artificial. Metabólitos foram extraídos e identificados por GC/MS e LC/MS. Os metabólitos obtidos foram analisados pelos bancos de dados *Human Metabolome Database* (HMDB), PubChem e *LIPID Metabolites and Pathways Strategy*. A análise das vias foi realizada utilizando o MetaboAnalyst 3.0. O uso combinado de GC e LC/MS permitiu a identificação de 371 compostos do FGA de carneiros. Estas técnicas apresentaram uma sobreposição de um único metabólito, confirmando a complementaridade das abordagens utilizadas. Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios foi a classe mais abundantes no FGA de carneiros, seguida por aminoácidos ácidos, peptídeos e análogos. Os metabólitos mais abundantes foram frutose, glicerol, ácido cítrico, D-manitol, D-glicose e ácido L-(+)-lático. Metabólitos identificados no FGA de carneiros estavam envolvidos em 52 diferentes vias. Os metabólitos do FGA atuam como moduladores da função espermática, portanto, a análise química do fluido das glândulas sexuais acessórias é valiosa para melhor entender a reprodução animal bem como para a investigação de biomarcadores da fertilidade.

Palavras-chave: GC/MS. Glândula sexuais acessória. LC/MS. Metaboloma.

ABSTRACT

The goal of this study was to characterize the major metabolome of accessory gland fluid of Morada Nova rams using two complementary techniques, i.e., gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). Five adult Morada Nova rams were vasectomized and accessory sex gland fluid (AGF) was collected by artificial vagina. Metabolites were extracted and identified by GC/MS and LC/MS. Metabolites obtained were analyzed by Human Metabolome Database (HMDB), PubChem, and LIPID Metabolites and Pathways Strategy databases. Pathway analysis was performed using MetaboAnalyst 3.0. Combined use of GC and LC/MS allowed the identification of 371 compounds from AGF of rams. These techniques presented an overlap of one single metabolite, thus confirming the complementarity of the approaches used. Lipids and lipid-like molecules were the most abundant classes in the ram AGF, followed by aminoacids, peptides, and analogues. The most abundant metabolites were fructose, glycerol, citric acid, D-mannitol, D-glucose and L-(+)-lactic acid. Metabolites identified in the ram AGF were involved in 52 different pathways. AGF metabolites are modulators of sperm function, thus chemical analysis of the accessory sex gland fluid is valuable to better understand animal reproduction and to search for biomarkers of fertility.

Keywords: GC/MS. Accessory sex gland. LC/MS. Metabolome.

3.1 Introdução

Morada Nova é uma raça de ovinos deslanados do Nordeste brasileiro e se destaca por sua prolificidade e adaptação às condições do semiárido. Dessa forma, esta raça representa importante recurso genético para os produtores de ovinos no Brasil (SELAIVE-VILLARROEL; FERNANDES, 2000; FACÓ et al., 2008). Nos sistemas de criação de ovinos, a eficiência reprodutiva é vital para a lucratividade econômica. O funcionamento adequado do sistema reprodutor masculino e feminino é necessário para produzir descendentes viáveis. Além disso, o conhecimento da fisiologia reprodutiva do carneiro é essencial para melhorar a eficiência reprodutiva do rebanho e as tecnologias de reprodução assistida. Mais especificamente, a fertilidade de carneiros é um fator crucial para os sistemas de produção, uma vez que cada reprodutor pode gerar um grande número de descendentes.

Moléculas associadas com a função espermática e fertilidade têm sido detectadas no plasma seminal e espermatozoides de carneiros Morada Nova (MARTINS et al., 2013; VAN TILBURG et al., 2013). *Ram Seminal Vesicle Proteins* (RSVPs) representam as principais proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova e estas moléculas podem interagir com o espermatozoide durante a ejaculação mediando o processo de capacitação (LUNA et al., 2014). RSVPs e outras importantes proteínas são secretadas principalmente pelas glândulas sexuais acessórias. As glândulas sexuais acessórias masculinas são importantes para o sucesso reprodutivo, uma vez que sua remoção diminui a fertilidade em ratos (PEITZ; OLDS-CLARKE, 1986). As secreções das glândulas sexuais acessórias podem afetar a taxa de clivagem do embrião e a implantação embrionária em hamsters, e também afetar o desenvolvimento embrionário e a saúde das crias em camundongos (O et al., 1988; BROMFIELD et al., 2014). Segundo Jiang et al. (2001) a exposição dos espermatozoides às substâncias produzidas pelas glândulas reprodutivas é crucial para a diferenciação e multiplicação celular após a implantação do embrião. Além disso, a fertilidade dos espermatozoides de touros de baixa fertilidade foi aumentada quando estas células foram misturadas com o fluido das glândulas sexuais acessórias de touros de alta fertilidade (HENAULT et al., 1995). Estas informações indicam claramente que as secreções das glândulas sexuais acessórias afetam a capacidade de fertilização do espermatozoide. De fato, componentes das glândulas sexuais acessórias, incluindo frutose, ácido cítrico, enzimas, proteínas e prostaglandinas, entre outros, desempenham papéis importantes no metabolismo, nutrição, proteção, transporte e fertilização espermática (JUYENA; STELLETTA, 2012).

Com o surgimento das tecnologias em espectrometria de massas e a

disponibilidade de ferramentas de bioinformática, a proteômica e a metabolômica se tornaram ferramentas valiosas para o estudo do sêmen e detecção de biomarcadores da fertilidade (EGEA et al., 2014). A metabolômica utiliza métodos e equipamentos sofisticados para detecção de compostos moleculares pequenos presentes em uma célula ou organismo que estão envolvidos nas reações metabólicas necessárias para o crescimento, desenvolvimento e reprodução (LIU; LOCASALE, 2017). O perfil metabolômico de tecidos e fluidos biológicos está promovendo um grande impacto sobre a pesquisa em fisiologia animal e humana, incluindo a detecção de marcadores moleculares de fenótipos específicos e diagnóstico de doenças (ATZORI et al., 2009).

Ferramentas analíticas comuns em metabolômica são ressonância magnética nuclear (NMR) e cromatografia gasosa (GC) ou líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas (MS). Cada método tem suas vantagens e desvantagens, diferindo na cobertura dos compostos e / ou sensibilidade de detecção (SHULAEV, 2006). GC/MS é a abordagem mais consolidada e compreende a separação de metabólitos polares e não polares voláteis e termicamente estáveis após a derivatização (CHACE, 2001). LC/MS é apropriada para a detecção de metabólitos menos estáveis, não voláteis e de massa molecular mais alta. Além disso, a LC/MS não requer derivatização química (ISSAQ et al., 2008). Normalmente, as duas abordagens são complementares; portanto, sua combinação viabiliza um perfil metabolômico mais amplo e, conseqüentemente, uma visão mais abrangente do metaboloma das amostras biológicas (MASTRANGELO et al., 2015). Tanto a LC como a GC/MS são técnicas não invasivas para a descoberta de marcadores moleculares através da detecção de modificações nas concentrações de metabólitos de fluidos reprodutivos, além de proporcionar melhor entendimento nos processos reprodutivos. Em humanos, através de GC/MS, 36 metabólitos foram identificados no plasma seminal como potenciais biomarcadores da azoospermia não obstrutiva (GILANY et al., 2017). Em animais de produção, o perfil do metaboloma do plasma seminal e de células espermáticas está ganhando importância. Estudos identificaram alguns metabólitos (citrato, leucina, isoleucina, ácido 2-oxoglutárico e frutose) como potenciais marcadores de fertilidade em touros (KUMAR et al., 2015; VELHO et al., 2018). Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o metaboloma do fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova utilizando duas técnicas complementares: a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) e a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC/MS).

3.2 Material e métodos

3.2.1 Animais e coleta do fluido

Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC/protocolo 1120270318). Cinco carneiros adultos Morada Nova, com aproximadamente 1,5 anos de idade, foram utilizados no presente estudo e submetidos à vasectomia. Os animais foram tranquilizados com xilazina (Rompun 2,0%) 0,015 mL/kg por via intramuscular e em seguida foi realizado um bloqueio local com cloridrato de lidocaína (Lidovet) para a realização da vasectomia. Após a recuperação completa dos animais, o fluido das glândulas acessórias (FGA) foi coletado pelo método de vagina artificial. Uma vez coletadas, as amostras foram centrifugadas ($5000 \times g$ por 30 min a 4°C) e armazenadas a -20°C .

3.2.2 Extração dos metabólitos

O fluido das glândulas acessórias foi liofilizado (Freezer Dryer, Labconco, EUA) a -50°C por 24h e pressão mínima de 0,035 mBar. As amostras liofilizadas (48 mg) foram ressuspensas em metanol a 80% (1:20), centrifugadas ($10500 \times g$ durante 15 min a 4°C) e o sobrenadante coletado. Em seguida, uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi transferida diretamente para *vials* e analisada por LC/MS. Uma segunda alíquota (200 μL) foi transferida para microtubos contendo 5 μL de ácido mirístico-d27 (cat # 366889; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As amostras foram secas *overnight* em um concentrador a vácuo (Eppendorf; Hamburg, Alemanha). Em seguida, adicionou-se 60 μL de hidrocloreto de metoxiamina a 2% em piridina (cat # 33045-U; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) aos extratos secos. As amostras foram incubadas e misturadas em um ThermoMixer® (Eppendorf; Hamburg, Alemanha) a 400 rpm por 3h30 a 37°C . Posteriormente, as amostras foram derivatizadas pela adição de 90 μL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorossilano (cat # 69478; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), incubadas e misturadas no ThermoMixer (400 rpm por 1h a 55°C). Finalmente, as amostras foram transferidas para *vials* e analisadas por GC/MS. Análises em triplicata foram realizadas para as determinações por LC/MS e GC/MS.

3.2.3 Análise por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC/MS)

A análise por LC/MS foi realizada através de um cromatógrafo líquido UHPLC 1290 acoplado a um espectrômetro de massa *quadrupole-time-of-flight* G6550 (ambos da Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), equipado com um sistema de ionização JetStream (UHPLC-ESI/QTOF-MS). As condições para análises metabolômicas baseadas em MS foram realizadas de acordo com experimentos anteriores (GHISONI et al., 2017). Resumidamente, a separação cromatográfica foi obtida utilizando-se fase móvel consistindo de água (A) e metanol (B) numa coluna Agilent Zorbax Eclipse-plus (75×2.1 mm i.d., 1.8 μ m). Um gradiente de eluição foi obtido a partir de 5% B até 90% B em 35 min, com fluxo de fase móvel de 220 μ L min^{-1} e temperatura de 35°C. HCOOH (0,1%, v/v) e formiato de amônio (5 mM) foram usados na fase móvel. O espectrômetro de massas foi operado em polaridade positiva para adquirir espectros no modo SCAN (faixa de 100–1200 m/z), enquanto as condições de *electrospray* foram as seguintes: pressão do nebulizador de 60 psig, tensão capilar de 4 kV, o gás de revestimento foi nitrogênio a 10 L min^{-1} (350°C) e gás de secagem foi nitrogênio a 10 L min^{-1} (280 °C).

Os dados brutos da LC/MS foram processados pelo software Profinder B.05 (Agilent Technologies) para características de deconvolução inicial, filtração e anotações. O alinhamento da massa e tempo de retenção (precisão da massa: 5 ppm; tolerância do tempo de retenção 0,1 min) foi feito antes das características serem anotadas usando o banco de dados comercial Metlin (banco de dados disponível localmente, fornecido pela Agilent Technologies em novembro de 2016). A anotação das características foi obtida usando-se todo o padrão isotópico (massa exata junto com espaçamento preciso e proporção de isótopos moleculares) após uma redução de compostos pós-alinhamento de filtros por frequência (apenas os compostos que estão em 100% das réplicas dentro de pelo menos um tratamento foram retidos). De acordo com a abordagem utilizada, a identificação foi realizada como Nível 2 (compostos com anotações putativas), de acordo com a COSMOS Metabolomics Standards Initiative (<http://cosmos-fp7.eu/msi>). Finalmente, os compostos foram filtrados por abundância (área > 10000 contagens).

3.2.4 Análise por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (GC/MS)

A análise GC/MS foi realizada utilizando-se um cromatógrafo a gás 6890 acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo 5977 (Agilent Technologies, Santa Clara,

CA, EUA) equipado com coluna capilar DB-5MS de 30 m. Extratos derivatizados (1 µl) foram injetados em modo *splitless* a 250°C, utilizando-se hélio como gás carreador (1 ml/min) e impacto de elétrons para fins de ionização. O forno do cromatógrafo gasoso foi programado, inicialmente, para ser mantido a 100°C por 2 minutos até 325°C a 10°C/min. Uma mistura de éster metílico de ácidos foi usada para fins de bloqueio do tempo de retenção (FAME mix, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA). Os recursos foram deconvoluídos usando o software “*Unknown Analysis*” (Agilent Technologies) e a identificação foi baseada na comparação espectral com o banco de dados comercialmente disponível, Fiehn Library (fornecido pela Agilent Technologies em maio de 2016).

3.2.5 Anotação dos metabólitos e análise das vias

Os metabólitos detectados por GC/MS e LC/MS foram classificados de acordo com o banco de dados Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca>) e PubChem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>). Os lipídios foram organizados em categorias de acordo com o LIPID Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS®) (<http://www.lipidmaps.org/>). A análise das vias dos metabólitos identificados no fluido das glândulas acessórias foi realizada utilizando o MetaboAnalyst 3.0, que incorpora análises de enriquecimento e topologia (Xia e Wishart, 2016). O programa usa vários bancos de dados, incluindo o KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) e o HMDB. A lista total dos metabólitos do fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova foi definida como fonte de dados de entrada. Foi selecionada a biblioteca da via *Bos taurus* (cow) [81]. Para os algoritmos de análise das vias, a *Over Representation Analysis* (ORA) foi incluída utilizando o Teste Exato de Fisher para avaliar se um determinado conjunto de metabólitos é representado mais do que o esperado por acaso dentro dos conjuntos de metabólitos. A centralidade relativa foi utilizada para a análise topológica da via. O valor de impacto calculado a partir da análise de topologia foi fixado em 0,6 para identificar as vias metabólicas mais relevantes.

3.3 Resultados

3.3.1 Metaboloma do fluido das glândulas acessórias

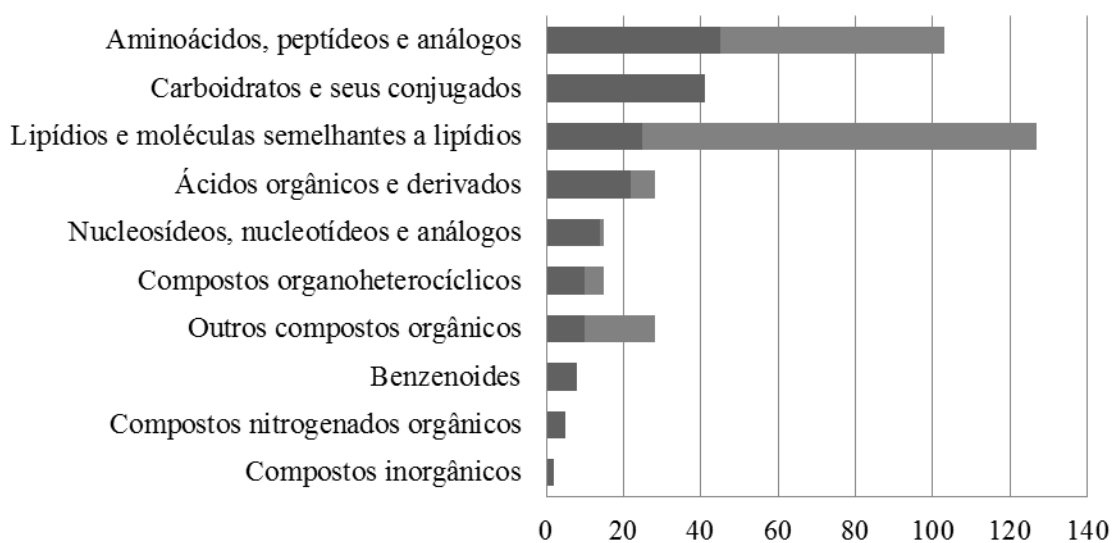
O uso combinado de GC e LC/MS permitiu a identificação de 371 compostos do

fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova. Dentre eles, 190 foram detectados por LC/MS e 182 por GC/MS. Estas técnicas apresentaram uma sobreposição de um único metabólito a L-ornitina (Figura 1), confirmando a complementaridade das abordagens utilizadas. Todos os metabólitos foram organizados em classes químicas de acordo com os bancos de dados HMDB e PubChem (Figura 2).

Figura 1 - Diagrama de Venn mostrando o número de metabólitos comuns e únicos identificados no fluido das glândulas acessórias de carneiros por LC/MS e GC/MS.

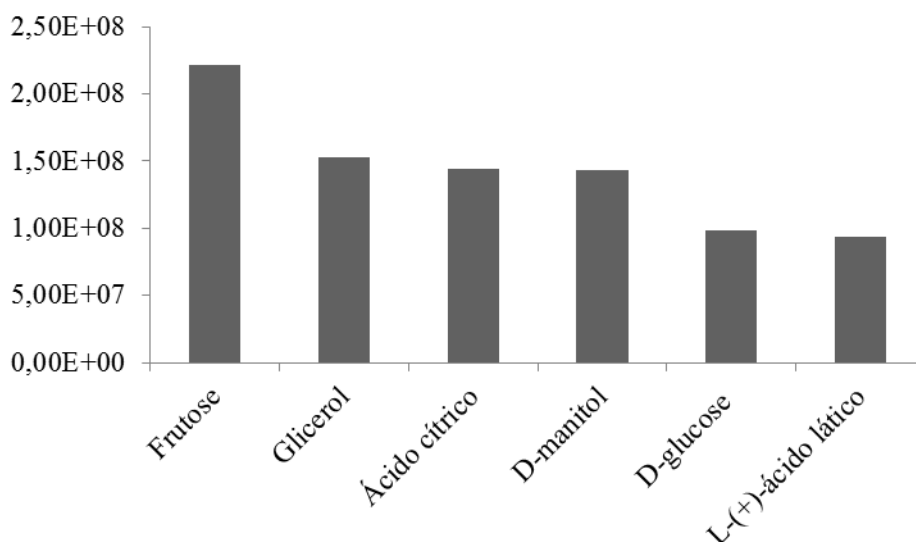


Figura 2. Número de metabólitos identificados por classe utilizando-se duas abordagens metabolômicas. Um total de 182 compostos foi detectado por GC/MS (cinza escuro) e 190 por LC/MS (cinza claro). Os metabólitos foram classificados de acordo com as ferramentas de busca *Human Metabolome Database* (HMDB) e PubChem.



A classe de lipídios e moléculas semelhantes a lipídeos foi a mais abundante no FGA, com 127 compostos (25 identificados por GC/MS e 102 por LC/MS), seguida por aminoácidos, peptídeos e análogos (103 metabólitos; 45 por CG/MS e 58 por LC/MS). Ácidos orgânicos e derivados, compostos organo-heterocíclicos, nucleosídeos, nucleotídeos e análogos também foram identificados por GC/MS e LC/MS. Carboidratos e seus conjugados, benzenoides, compostos nitrogenados orgânicos e compostos inorgânicos foram detectados apenas por CG/MS. Os metabólitos mais abundantes presentes no FGA de carneiros foram frutose, glicerol, ácido cítrico, D-manitol, D-glucose e ácido L-(+)-lático (Figura 3).

Figura 3 - Gráfico representativo dos metabólitos mais abundantes detectados no fluido das glândulas acessórias de carneiros.



3.3.2 Metabólitos identificados por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas

Por GC/MS, foram identificados 182 compostos (Tabela 1). As classes mais representativas de metabólitos foram aminoácidos, peptídeos e análogos (45 metabólitos), seguidos por carboidratos e seus conjugados (41 compostos). Os metabólitos menos abundantes do FGA de carneiros foram compostos inorgânicos (2) e compostos nitrogenados orgânicos (5).

Tabela 1 - Metabólitos do fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova identificados por GC/MS. Os metabólitos foram classificados de acordo com os bancos de dados HMDB e PubChem. A fórmula química e o número CAS foram incluídos, ambos representam informações importantes para a classificação dos compostos. O ID do HMDB também é especificado.

Composto	Tempo de retenção	Fórmula	Número CAS	HMDB ID
Carboidratos e seus conjugados				
1,5-anidro-D-sorbitol	16.967	C ₆ H ₁₂ O ₅	154-58-5	HMDB0002712
2-deoxi-D-ribose	13.84	C ₅ H ₁₀ O ₄	533-67-5	HMDB0003224
Ácido 3-fosfoglicérico	16.504	C ₃ H ₇ O ₇ P	820-11-1	HMDB0000807
6-deoxi-D-glucose	15.751	C ₆ H ₁₂ O ₅	7658-08-4	-
Ácido 6-fosfogluconico	22.289	C ₆ H ₁₃ O ₁₀ P	921-62-0	HMDB0001316
Alfa-D-glucosamina 1-fosfato	16.61	C ₆ H ₁₄ NO ₈ P	2152-75-2	HMDB0001109
Arabinose	14.897	C ₅ H ₁₀ O ₅	5328-37-0	HMDB0000646
Arabitol	15.601	C ₅ H ₁₂ O ₅	488-82-4	HMDB0000568
D-(+)-galactose	17.409	C ₆ H ₁₂ O ₆	59-23-4	HMDB0000143
D-(+)-trealose	24.752	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	99-20-7	HMDB0000975
D-glucose-6-fosfato	21.558	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	56-73-5	-
D-glucose	17.426	C ₆ H ₁₂ O ₆	50-99-7	HMDB0000122
DL-gliceraldeído	9.186	C ₃ H ₆ O ₃	56-82-6	HMDB0001051
DL-gliceraldeído 3-fosfato	15.592	C ₃ H ₇ O ₆ P	142-10-9	HMDB0001112
D-manitol	17.81	C ₆ H ₁₄ O ₆	69-65-8	HMDB0000765
D-manose	17.435	C ₆ H ₁₂ O ₆	3458-28-4	HMDB0000169
D-ribose-5-fosfato	19.548	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	3615-55-2	HMDB0001548
D-sorbitol	17.898	C ₆ H ₁₄ O ₆	50-70-4	HMDB0000247
D-treitol	12.954	C ₄ H ₁₀ O ₄	2418-52-2	HMDB0004136
Frutose	17.18	C ₆ H ₁₂ O ₆	53188-23-1	HMDB0000660
Frutose-1,6-difosfato	24.508	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	488-69-7	HMDB0001058
Galactinol	26.085	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	3687-64-7	HMDB0005826
Galactosamina	17.386	C ₆ H ₁₃ NO ₅	90-76-6	-
Ácido galacturônico	17.917	C ₆ H ₁₀ O ₇	14982-50-4	HMDB0002545
Ácido glucônico	18.297	C ₆ H ₁₂ O ₇	526-95-4	HMDB0000625
Ácido glucurônico	17.754	C ₆ H ₁₀ O ₇	6556-12-3	HMDB0000127
Glucuronolactona	16.97	C ₆ H ₈ O ₆	32449-92-6	HMDB0006355
Ácido glicérico	10.735	C ₃ H ₆ O ₄	473-81-4	HMDB0000139
Glicerol	9.941	C ₃ H ₈ O ₃	56-81-5	HMDB0000131
Isomaltose	25.863	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	499-40-1	HMDB0002923
Ácido lactobiônico	24.893	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂	96-82-2	-
Lactose	24.386	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	63-42-3	HMDB0000186
L-sorbose	17.187	C ₆ H ₁₂ O ₆	87-79-6	HMDB0001266
Maltose	24.702	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	69-79-4	HMDB0000163
Mio-inositol	19.354	C ₆ H ₁₂ O ₆	87-89-8	HMDB0000211
N-acetil-D-glucosamina	19.196	C ₈ H ₁₅ NO ₆	7512-17-6	HMDB0000215

N-acetil-D-manosamina	19.177	C ₈ H ₁₅ NO ₆	3615-17-6	HMDB0062724
Ramnose	15.656	C ₆ H ₁₂ O ₅	3615-41-6	HMDB0000849
Ribose	15.113	C ₅ H ₁₀ O ₅	50-69-1	HMDB0000283
Ribitol	15.66	C ₅ H ₁₂ O ₅	488-81-3	HMDB0000508
Xilitol	15.376	C ₅ H ₁₂ O ₅	87-99-0	HMDB0002917
Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios				
22-hidroxicolesterol	28.36	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	22348-64-7	HMDB0004035
Ácido 2-isopropilmálico	13.836	C ₇ H ₁₂ O ₅	3237-44-3	HMDB0000402
5alfa-Androstan-3, 17-Diona	24.357	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	846-46-8	-
5alfa-Colestan-3beta-Ol-6-Ona	29.251	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	-	-
Ácido araquídico	22.367	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	506-30-9	HMDB0002212
Ácido azelaico	16.359	C ₉ H ₁₆ O ₄	123-99-9	HMDB0000784
Beta-hidroxiisovalerato	9.084	C ₅ H ₁₀ O ₃	625-08-1	HMDB0000754
Ácido cáprico	12.399	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	334-48-5	HMDB0000511
Colesterol	27.555	C ₂₇ H ₄₆ O	57-88-5	HMDB0000067
Ácido citracônico	11.003	C ₅ H ₆ O ₄	498-23-7	HMDB0000634
Ácido citrário	12.63	C ₅ H ₈ O ₅	597-44-4	HMDB0000426
Deoxiglucose	16.321	C ₆ H ₁₂ O ₅	154-17-6	HMDB0062477
Ácido eicosapentaenoico	24.013	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	10417-94-4	HMDB0001999
Glicerol 1-fosfato	16.056	C ₃ H ₉ O ₆ P	57-03-4	HMDB0000126
Ácido heptadecanoico	19.8	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	506-12-7	HMDB0002259
Ácido hexanoico	7.11	C ₆ H ₁₂ O ₂	142-62-1	HMDB0000535
Ácido itacônico	10.839	C ₅ H ₆ O ₄	97-65-4	HMDB0002092
Ácido linoleico	20.399	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	60-33-3	HMDB0000673
Ácido palmítico	18.846	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	57-10-3	HMDB0000220
Ácido palmitoleico	18.728	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	373-49-9	HMDB0003229
Ácido fitânico	20.285	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	14721-66-5	HMDB0000801
Fitosfingosina	23.812	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	554-62-1	HMDB0004610
Ácido estearico	20.675	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	57-11-4	HMDB0000827
Tetrahidrocorticosterona	27.497	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	68-42-8	HMDB0000268
Turanose	24.81	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	547-25-1	HMDB0011740
Aminoácidos, peptídeos e análogos				
3-cloro-L-tirosina	19.154	C ₉ H ₁₀ ClNO ₃	7423-93-0	HMDB0001885
3-nitro-L-tirosina	20.658	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₅	621-44-3	HMDB0001904
5-hidroxi-L-triptofano	22.328	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₃	4350-09-8	HMDB0000472
Acetil-L-serina	11.574	C ₅ H ₉ NO ₄	16354-58-8	HMDB0002931
Ácido aspártico	13.207	C ₅ H ₉ NO ₄	16354-58-8	HMDB0002931
Beta-alanina	14.555	C ₃ H ₇ NO ₂	107-95-9	HMDB0000056
Beta-ciano-L-alanina	11.288	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	6232-19-5	-
Creatinina	13.629	C ₄ H ₇ N ₃ O	60-27-5	HMDB0000562
Cicloleucina	11.282	C ₆ H ₁₁ NO ₂	52-52-8	HMDB0062225
Cisteinilglicina	16.586	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	19246-18-5	HMDB0000078
DL-isoleucina	8.576	C ₆ H ₁₃ NO ₂	443-79-8	-
Glicina	10.456	C ₂ H ₅ NO ₂	56-40-6	HMDB0000123
Glicil-L-tirosina	23.891	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄	658-79-7	HMDB0028853

Glicil-tirosil-alanina	25.96	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₅	-	-
Ácido guanidinoacético	13.855	C ₃ H ₇ N ₃ O ₂	352-97-6	HMDB0000128
L-alotreonina	16.365	C ₄ H ₉ NO ₃	24830-94-2	HMDB0004041
L-alanina	7.4748	C ₃ H ₇ NO ₂	56-41-7	HMDB0000161
Ácido L-cisteico	17.953	C ₃ H ₇ NO ₅ S	498-40-8	HMDB0002757
L-cisteína	12.544	C ₃ H ₇ NO ₂ S	52-90-4	HMDB0000574
Ácido L-glutâmico	14.398	C ₅ H ₉ NO ₄	56-86-0	HMDB0000148
L-histidina	17.658	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	71-00-1	HMDB0000177
L-homoserina	11.141	C ₄ H ₉ NO ₃	672-15-1	HMDB0000719
L-leucina	8.298	C ₆ H ₁₃ NO ₂	61-90-5	HMDB0000687
L-lisina	17.643	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	56-87-1	HMDB0000182
L-ornitina	14.349	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	3184-13-2	HMDB0000214
L-prolina	10.321	C ₅ H ₉ NO ₂	147-85-3	HMDB0000162
Ácido L-piroglutâmico	13.218	C ₅ H ₇ NO ₃	98-79-3	HMDB0000267
L-serina	11.174	C ₃ H ₇ NO ₃	56-45-1	HMDB0000187
L-treonina	11.464	C ₄ H ₉ NO ₃	72-19-5	HMDB0000167
L-tirosina	17.856	C ₉ H ₁₁ NO ₃	60-18-4	HMDB0000158
L-valina	9.151	C ₅ H ₁₁ NO ₂	72-18-4	HMDB0000883
N-acetil-D-triptofano	21.742	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	1218-34-4	HMDB0013713
Ácido N-acetil-L-aspartico	14.955	C ₆ H ₉ NO ₅	997-55-7	HMDB0000812
Ácido N-acetil-L-glutâmico	13.063	C ₇ H ₁₁ NO ₅	1188-37-0	HMDB0001138
N-acetil-L-fenilalanina	16.476	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	2018-61-3	HMDB0000512
N-acetil-ornitina	18.409	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	-	HMDB0003357
N-etilglicina	6.458	C ₄ H ₉ NO ₂	627-01-0	HMDB0041945
Ácido N-metilglutâmico	13.755	C ₆ H ₁₁ NO ₄	35989-16-3	HMDB0062660
N,N-dimetilglicina	6.332	C ₄ H ₉ NO ₂	1118-68-9	HMDB0000092
Norvalina	9.468	C ₅ H ₁₁ NO ₂	760-78-1	HMDB0013716
O-fosfo-L-serina	16.652	C ₃ H ₈ NO ₆ P	17885-08-4	HMDB0001721
O-fosfo-L-treonina	16.652	C ₄ H ₁₀ NO ₆ P	1114-81-4	HMDB0011185
Ácido pantotênico	17.903	C ₉ H ₁₇ NO ₅	79-83-4	HMDB0000210
Fenilalanina	13.545	C ₉ H ₁₁ NO ₂	63-91-2	HMDB0000159
Trans-3-hidroxi-L-prolina	12.603	C ₅ H ₉ NO ₃	4298-08-2	HMDB0059659
Nucleosídeos, nucleotídeos e análogos				
1-metiladenosina	24.891	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄	15763-06-1	HMDB0003331
2'-deoxicidina	10.037	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	951-77-9	HMDB0000014
2'-deoxiguanosina	24.95	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	961-07-9	HMDB0000085
3'-deoxiuridina	21.258	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅	7057-27-4	-
5'-deoxi-5'-(metiltio)adenosina	24.627	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	2457-80-9	HMDB0001173
Adenosina	23.825	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	58-61-7	HMDB0000050
GMP cíclico	27.671	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₇ P	7665-99-8	HMDB0001314
Citidina	22.611	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	65-46-3	HMDB0000089
Citidina -5'-monofosfato	18.663	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	63-37-6	HMDB0000095
Citosina	14.524	C ₄ H ₅ N ₃ O	71-30-7	HMDB0000630
Guanosina	24.749	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	118-00-3	HMDB0000133
Inosina	23.396	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	58-63-9	HMDB0000195

Timina	11.599	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	65-71-4	HMDB0000262
Uracil	10.777	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	66-22-8	HMDB0000300
Compostos nitrogenados orgânicos				
1,3-diaminopropano	14.708	C ₃ H ₁₀ N ₂	109-76-2	HMDB0000002
Etanolamina	9.879	C ₂ H ₇ NO	141-43-5	HMDB0000149
Ácido guanidinopropiônico	13.895	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	353-09-3	HMDB0013222
Putrescina	15.709	C ₄ H ₁₂ N ₂	110-60-1	HMDB0001414
Espermina	24.772	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	71-44-3	HMDB0001256
Compostos organo-heterocíclicos				
Ácido 3-indolelático	20.077	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	1821-52-9	HMDB0000671
5,6-dihidrouracil	12.314	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	504-07-4	HMDB0000076
Alantoína	17.356	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	97-59-6	HMDB0000462
Biotina	22.566	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	58-85-5	HMDB0000030
Ácido dehidroascórbico	16.863	C ₆ H ₆ O ₆	490-83-5	HMDB0001264
Hipoxantina	16.479	C ₅ H ₄ N ₄ O	68-94-0	HMDB0000157
Isoxantopterin	19.714	C ₆ H ₅ N ₅ O ₂	529-69-1	HMDB0000704
Ácido L-ascórbico	17.939	C ₆ H ₈ O ₆	50-81-7	HMDB0000044
Piridoxina	17.385	C ₈ H ₁₁ NO ₃	65-23-6	HMDB0000239
Ácido úrico	19.331	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	69-93-2	HMDB0000289
Benzenoides				
2-fenilacetamida	11.591	C ₈ H ₉ NO	103-81-1	HMDB0010715
Ácido benzoico	9.594	C ₇ H ₆ O ₂	65-85-0	HMDB0001870
Ácido DL-4-hidroxi-3-metoxiamandélico	17.152	C ₉ H ₁₀ O ₅	55-10-7	HMDB0000291
Ácido hipúrico	16.87	C ₉ H ₉ NO ₃	495-69-2	HMDB0000714
Mono(2-etilhexil)ftalato	19.512	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	4376-20-9	HMDB0013248
Norepinefrina	19.889	C ₈ H ₁₁ NO ₃	51-41-2	HMDB0000216
Fenetilamina	13.742	C ₈ H ₁₁ N	64-04-0	HMDB0012275
Ácido ftálico	15.218	C ₈ H ₆ O ₄	88-99-3	HMDB0002107
Ácidos orgânicos e derivados				
1-metilhidantoína	11.161	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	616-04-6	HMDB0003646
Ácido 2-aminooctanóico	12.861	C ₈ H ₁₇ NO ₂	644-90-6	HMDB0000991
Ácido 2-cetobutírico	7.504	C ₄ H ₆ O ₃	600-18-0	HMDB0000005
5,6-dihidro-5-metiluracil	11.637	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	696-04-8	HMDB0000079
Acetoacetato	7.603	C ₄ H ₆ O ₃	541-50-4	HMDB0000060
Ácido cítrico	16.615	C ₆ H ₈ O ₇	77-92-9	HMDB0000094
Citrulina	16.691	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	372-75-8	HMDB0000904
Ácido di-hidrorótico	16.031	C ₅ H ₆ N ₂ O ₄	5988-19-2	HMDB0003349
Ácido fumárico	10.94	C ₄ H ₄ O ₄	110-17-8	HMDB0000134
Ácido glutacônico	12.3423	C ₅ H ₆ O ₄	1724-02-3	HMDB0000620
Ácido glicólico	7.049	C ₂ H ₄ O ₃	79-14-1	HMDB0000115
Ácido L-(+)-láctico	6.851	C ₃ H ₆ O ₃	79-33-4	HMDB0000190
Ácido maleico	10.323	C ₄ H ₄ O ₄	110-16-7	HMDB0000176
Ácido malônico	11.938	C ₃ H ₄ O ₄	141-82-2	HMDB0000691
Ácido metilmalônico	9.088	C ₄ H ₆ O ₄	516-05-2	HMDB0000202
N-omega-acetil-histamina	16.804	C ₇ H ₁₁ N ₃ O	673-49-4	HMDB0013253

Ácido oxaloacético	12.45	C ₄ H ₄ O ₅	328-42-7	HMDB0000223
Ácido fosfoglicólico	14.122	C ₂ H ₅ O ₆ P	13147-57-4	HMDB0000816
Ácido pirúvico	6.714	C ₃ H ₄ O ₃	127-17-3	HMDB0000243
Ácido succínico	10.509	C ₄ H ₆ O ₄	110-15-6	HMDB0000254
Taurina	14.94	C ₂ H ₇ NO ₃ S	107-35-7	HMDB0000251
Ureia	9.599	CH ₄ N ₂ O	57-13-6	HMDB0000294
Outros compostos orgânicos				
2-aminoetanotiol	21.574	C ₂ H ₇ NS	60-23-1	HMDB0002991
2-deoxiribose 5-fosfato	18.703	C ₅ H ₁₁ O ₇ P	102916-66-5	HMDB0001031
Ácido 3- (4-hidroxifenil) láctico	17.433	C ₉ H ₁₀ O ₄	306-23-0	HMDB0000755
Acetol	15.293	C ₃ H ₆ O ₂	116-09-6	HMDB0006961
DL-dihidroesfingosina	22.839	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	13552-09-5	-
D-esfingosina	22.326	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	123-78-4	-
L-ditiotreitol	17.086	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	16096-97-2	HMDB0013593
L-quinurenina	19.994	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	343-65-7	HMDB0000684
Ácido N-acetilneuramínico	23.855	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉	131-48-6	HMDB0000230
Ácido trionônico	13.652	C ₄ H ₈ O ₅	3909-12-4	HMDB0000943
Compostos inorgânicos				
Ácido fosfórico	9.966	H ₃ O ₄ P	7664-38-2	HMDB0002142
Pirofosfato	14.993	O ₇ P ₂	14000-31-8	HMDB0000250

3.3.3 Metabólitos identificados por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas

LC/MS identificou 190 compostos no fluido das glândulas acessórias de ovinos (Tabela 2). Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios foram os metabólitos abundantes no FGA, englobando 102 moléculas. Os metabólitos menos abundantes foram nucleosídeos, nucleotídeos e análogos com apenas um composto. Uma vez que os lipídios representaram a principal classe de metabólitos, eles foram agrupados em categorias de acordo com o LIPID MAPS® (Figura 4). Os glicerofosfolipídios foram a principal categoria, apresentando 43 metabólitos.

Tabela 2. Metabólitos do fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova identificados por LC/MS. Os metabólitos foram classificados de acordo com os banco de dados HMDB e PubChem. Os lipídios foram organizados em categorias de acordo com os LIPID *Metabolites and Pathways Strategy* (LIPID MAPS®). LIPID MAPS ID (LM_ID) é detalhado. A fórmula química, o número CAS e o PubChem Compound ID também foram adicionados.

Composto	Fórmula	Número CAS	PubChem Compound ID	LM_ID
Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios				
<i>Acil graxo</i>				
10,11-Difluoro-8E,10E-dodecadien-1-ol	C ₁₂ H ₂₀ F ₂ O	-	14310982	LMFA05000167
10,13,16- ácido docosatriinóico	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	-	9543600	LMFA01030685
11-dehidro-TXB2-d4	C ₂₀ H ₂₈ D ₄ O ₆	1240398-15-5	24778496	LMFA03030011
12Z,15Z- ácido heneicosadienóico	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	191545-08-1	5312548	LMFA01030399
13-OxoODE	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	54739-30-9	6446027	LMFA02000016
23-metil-5Z,9Z- ácido tetracosadienóico	C ₂₅ H ₄₆ O ₂	140245-76-7	5312325	LMFA01020233
2E-tetradecenoil-CoA	C ₃₅ H ₆₀ N ₇ O ₁₇ P ₃ S	38795-33-4	16061166	LMFA07050021
3- hidroximetilo-CoA	C ₃₅ H ₆₂ N ₇ O ₁₈ P ₃ S	-	44256592	LMFA07050033
3S-ácido aminodecanoico	C ₁₀ H ₂₁ NO ₂	84276-16-4	5312962	LMFA01100011
7Z,11Z,14Z- ácido eicosatrienóico	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	-	5312536	LMFA01030386
9E,12Z,15E- ácido octadecatrienóico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	21661-12-1	5312500	LMFA01030349
CPA(18:2(9Z,12Z)/0:0)	C ₂₁ H ₃₇ O ₆ P	-	53477947	-
Metil 10,13-dihidroxi-9-oxo-11- octadecenoato	C ₁₉ H ₃₄ O ₅	-	5282974	LMFA01050150
Metil 8-[2-(2-formil-vinil)-3-hidroxi-5-oxo-ciclopentil]-octanoato	C ₁₇ H ₂₆ O ₅	-	5282975	LMFA01050151
N'-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoil-N"-dietil-etilenodiamina	C ₂₆ H ₄₆ N ₂ O	-	5283407	LMFA08020022
N- estearoil valina	C ₂₃ H ₄₅ NO ₃	14379-32-9	14809078	LMFA08020122
10-Nitrooleato	C ₁₈ H ₃₃ NO ₄	88127-53-1	53442606	-
2,3-dinor Tromboxano B1	C ₁₈ H ₃₂ O ₆	196493-76-2	52921884	LMFA03030012
20-carboxi-LTB4	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	80434-82-8	5280877	LMFA03020016
Oleato glicidil	C ₂₁ H ₃₈ O ₃	5431-33-4	5354568	-
GW 7647	C ₂₉ H ₄₆ N ₂ O ₃ S	265129-71-3	3392731	-
GW 9578	C ₂₆ H ₃₄ F ₂ N ₂ O ₃ S	247923-29-1	9870304	-
<i>Glicerolipídios</i>				
DG(14:1(9Z)/18:3(9Z,12Z,15Z)/0:0)	C ₃₅ H ₆₀ O ₅	-	53477982	LMGL02010410
DG(14:1(9Z)/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	C ₃₇ H ₆₂ O ₅	-	53477989	LMGL02010416
DG(16:0/20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0)	C ₃₉ H ₇₀ O ₅	-	53478028	-

)					
DG(19:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0)[iso2]	C ₄₂ H ₇₄ O ₅	-	9543818	LMGL02010153	
TG(16:1(9Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso6]	C ₆₁ H ₉₄ O ₆	-	9545649	LMGL03011688	
Glicerofosfolípídios		-			
LysoPE(0:0/16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	-	53480922	LMGP02050036	
LysoPE(0:0/20:3(11Z,14Z,17Z))	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	-	53480933	LMGP02050048	
LysoPE(0:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	C ₂₇ H ₄₄ NO ₇ P	-	53480945	LMGP02050060	
PA(18:0/0:0)	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P	-	9547179	LMGP10050005	
PA(19:3(10Z,13Z,16Z)/0:0)	C ₂₂ H ₃₉ O ₇ P	-	5283537	LMGP10050004	
PA(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0)	C ₂₃ H ₃₉ O ₇ P	-	42607498	LMGP10050013	
PA(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:1(11Z))	C ₄₇ H ₈₃ O ₈ P	-	52929406	LMGP10010813	
PE(11:0/10:0)[U]	C ₂₆ H ₅₂ NO ₈ P	-	14714215	LMGP02010254	
PE(15:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	C ₃₈ H ₆₆ NO ₈ P	-	52924193	LMGP02010490	
PE(17:0/15:0)[U]	C ₃₇ H ₇₄ NO ₈ P	-	14714213	LMGP02010252	
PE(17:2(9Z,12Z)/0:0)	C ₂₂ H ₄₂ NO ₇ P	-	52925135	LMGP02050016	
PE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	-	52925130	LMGP02050011	
PE(18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0)	C ₂₃ H ₄₂ NO ₇ P	-	52925136	LMGP02050011	
PE(P-16:0/13:0)	C ₃₄ H ₆₈ NO ₇ P	-	52925041	LMGP02030008	
PE(P-16:0/14:0)	C ₃₅ H ₇₀ NO ₇ P	-	52925042	LMGP02030009	
PG(18:0/0:0)[U]	C ₂₄ H ₄₉ O ₉ P	-	14714412	LMGP04050005	
PG(18:2(9Z,12Z)/0:0)	C ₂₄ H ₄₅ O ₉ P	-	52927437	LMGP04050014	
PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₀ P	-	52926706	LMGP04010441	
PG(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)	C ₄₉ H ₈₉ O ₁₀ P	-	52927440	LMGP04050017	
)					
PG(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/21:0)	C ₂₈ H ₄₉ O ₉ P	-	52927077	LMGP04010812	
PG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	C ₅₀ H ₇₅ O ₁₀ P	-	52927240	LMGP04010977	
PG(O-16:0/12:0)	C ₃₄ H ₆₉ O ₉ P	-	52927249	LMGP04020001	
PI(16:1(9Z)/14:1(9Z))	C ₃₉ H ₇₁ O ₁₃ P	-	52927625	LMGP06010172	
PI(18:0/0:0)	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	-	42607495	LMGP06050004	
PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	C ₂₉ H ₄₇ O ₁₂ P	-	52928621	LMGP06050026	
PI(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:1(11Z))	C ₅₃ H ₈₉ O ₁₃ P	-	52928265	LMGP06010812	
PS(18:0/20:0)	C ₄₄ H ₈₆ NO ₁₀ P	-	52926059	LMGP03010952	
PS(18:2(9Z,12Z)/0:0)	C ₂₄ H ₄₄ NO ₉ P	-	52926279	LMGP03050011	
PS(20:1(11Z)/0:0)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₉ P	-	52926288	LMGP03050020	
PS(20:3(8Z,11Z,14Z)/0:0)	C ₂₆ H ₄₆ NO ₉ P	-	52926290	LMGP03050022	
PS(22:0/0:0)	C ₂₈ H ₅₆ NO ₉ P	-	52926293	LMGP03050025	
PS(22:0/18:1(9Z))	C ₄₆ H ₈₈ NO ₁₀ P	-	52926052	LMGP03010945	
PS(O-16:0/0:0)	C ₂₂ H ₄₆ NO ₈ P	-	52926303	LMGP03060003	
PS(O-16:0/18:0)	C ₄₀ H ₈₀ NO ₉ P	-	52926169	LMGP03020080	
PS(O-16:0/22:0)	C ₄₄ H ₈₈ NO ₉ P	-	52926178	LMGP03020089	
PS(O-20:0/17:0)	C ₄₃ H ₈₆ NO ₉ P	-	52926137	LMGP03020048	
PS(O-	C ₄₈ H ₈₄ NO ₉ P	-	52926182	LMGP03020093	

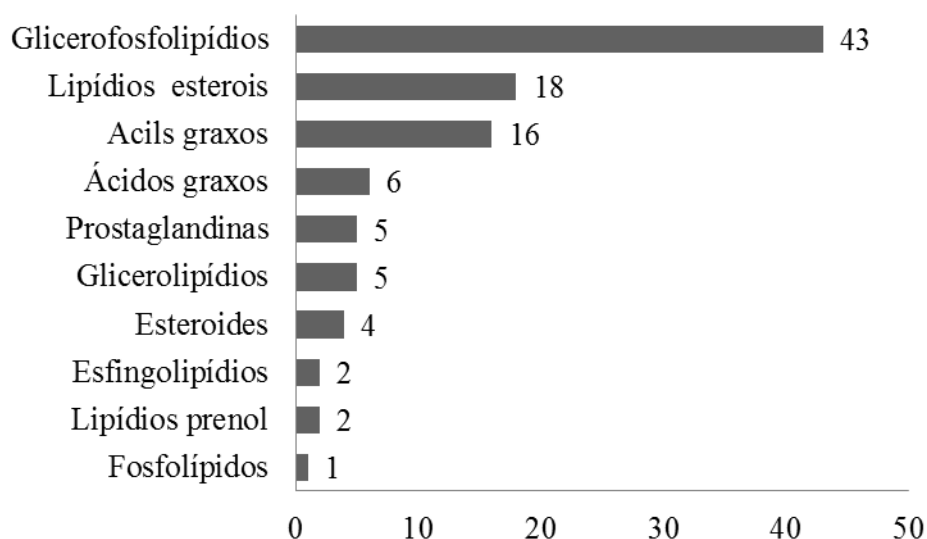
20:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))				
PS(P-16:0/22:0)	C ₄₄ H ₈₆ NO ₉ P	-	52926206	LMGP03030024
PS(P-16:0/22:1(11Z))	C ₄₄ H ₈₄ NO ₉ P	-	52926207	LMGP03030025
PS(P-18:0/20:3(8Z,11Z,14Z))	C ₄₄ H ₈₀ NO ₉ P	-	52926231	LMGP03030049
PS(P-20:0/16:1(9Z))	C ₄₂ H ₈₀ NO ₉ P	-	52926245	LMGP03030063
PS(P-20:0/19:1(9Z))	C ₄₅ H ₈₆ NO ₉ P	-	52926256	LMGP03030074
PS(P-20:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	C ₄₆ H ₈₂ NO ₉ P	-	52926261	LMGP03030079
Prenois				
Ácido 3-decaprenil-4,5-dihidroxi-benzóico	C ₅₇ H ₈₆ O ₄	-	25010746	LMPR02010034
Alicopterosinas O	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	-	10847307	LMPR0103610002
Prostaglandinas				
15-deoxi-δ-12,14-PGJ2-d4	C ₂₀ H ₂₄ D ₄ O ₃	87893-55-8	-	-
17-fenil trinor PGF2α dietilamida	C ₂₇ H ₄₁ NO ₄	1176637-26-5	-	-
PGE2-d4	C ₂₀ H ₂₈ D ₄ O ₅	-	5283031	LMFA03010008
PGF2alfa-EA(d4)	C ₂₂ H ₃₅ D ₄ NO ₅	-	44256511	LMFA03010207
PGI2-EA	C ₂₂ H ₃₇ NO ₅	-	53477456	LMFA03010218
Fosfolipídios				
Ácido fosfatídico 3-carbacílico palmitoleoílo	C ₂₀ H ₃₇ O ₅ P	910228-13-6	-	-
Esfingolipídios				
Galabiosilceramida (d18:1/25:0)	C ₅₅ H ₁₀₅ NO ₁₃	77538-38-6	-	-
Galalfa1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer (d18: 1/16: 0)	C ₅₂ H ₉₇ NO ₁₈		85297436	LMSP0502AA01
Esterois				
(5Z, 10Z) -19-fluoro-1? - Hidroxivitamina-D3 / (5Z, 10Z) -19-fluoro-1? - Hidroxicolecalciferol	C ₂₇ H ₄₃ FO ₂	-	9547415	LMST03020204
1α, 25-di-hidroxi-23,24-dinorvitamina D3 / 1α, 25-di-hidroxi-23,24-dinorcholecalciferol	C ₂₅ H ₄₀ O ₃	-	9547287	LMST03020027
1α, 25-di-hidroxi-24-oxo-23-azavitamina D2 / 1α, 25-di-hidroxi-24-oxo-23-azaergocalciferol	C ₂₇ H ₄₃ NO ₄	-	9547223	LMST03010007
1α, 25-di-hidroxi-2p- (6-hidroxi-hexil) vitamina D3 / 1α, 25-di-hidroxi-2β- (6-hidroxi-hexil) colecalciferol	C ₃₃ H ₅₆ O ₄	-	9547638	LMST03020534
1β, 25-di-hidroxi-3-desoxi-19-norvitamina D3 / 1β, 25-di-hidroxi-3-desoxi-19-norcholecalciferol	C ₂₆ H ₄₄ O ₂	-	9547658	LMST03020563
20:5 Éster de colesterilo	C ₄₇ H ₇₄ O ₂	-	10372299	LMST01020015
26,27-dietil-1α, 25-di-hidroxitamina D3 / 26,27-dietil-1α, 25-di-hidroxicolecalciferol	C ₃₁ H ₅₂ O ₃	-	9547602	LMST03020498
Ácido 3α-hidroxi-5β-col-14-	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	-	5283967	LMST04010204

en-24-oico				
Ácido 3β, 12β-di-hidroxi-5α-colan-24-oico	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	-	5283836	LMST04010047
4,4-difluoro-1α-hidroxitamina D3 / 4,4-difluoro-1α-hidroxicolecalciferol	C ₂₇ H ₄₂ F ₂ O ₂	-	9547383	LMST03020138
5β-colano-3α, 7α, 24-triol	C ₂₄ H ₄₂ O ₃	-	5284062	LMST04010314
Kurilideside E	C ₃₃ H ₅₈ O ₁₀	-	52931568	LMST05050014
26,26,26,27,27,27-hexafluoro-25-hidroxitamina D2	C ₂₈ H ₃₈ F ₆ O ₂	-	56940695	LMST03010008
1α-fluoro-25-hidroxi-16,17,23,23,24,24-hexadeidrovitamina D3 / 1α-fluoro-25-hidroxi-16,17,2(20S,24R)-20-fluoro-1α,24-dihidroxi-26,27-ciclovitamina D3 / (20S,24R)-20-fluoro-1α,24-dihidroxi	C ₂₇ H ₃₇ FO ₂	-	9547335	LMST03020084
1α-hidroxi-22-(3-hidroxi-22-(3-hidroxi-24,24-difluoro-1α,25-dihidroxi-26,27-dimetilvitamina D3 / 24,24-difluoro-1α,25-dihidroxi-26	C ₂₇ H ₄₁ FO ₃	-	9547373	LMST03020128
N-[(3a,5b,7a,12a)-3,12-dihidroxi-24-oxo-7-(sulfoxi)cholan-24-yl]-Glicine	C ₂₈ H ₃₈ O ₃	-	9547458	LMST03020310
Esteroides				
17-Metil-3-(2,4-ciclopentadieno-1-ilidene)-5alfa-androstano-17beta-ol	C ₂₉ H ₄₆ F ₂ O ₃	-	9547511	LMST03020403
3,3-Difluoro-5alfa-androstan-17beta-il acetato	C ₂₆ H ₄₃ NO ₉ S	-	20849198	LMST05030010
3beta-Hidroxi-16-fosfonopregn-5-en-20-one monoetil ester	C ₂₅ H ₃₆ O	6952-09-6	247748	-
Estra-1,3,5(10),16-tetraen-3-ol benzoato	C ₂₁ H ₃₂ F ₂ O ₂	1827-75-4	243754	-
Aminoácidos, péptidos e análogos				
Ácido 2S-aminoheptanóico	C ₂₃ H ₃₇ O ₅ P	14413-03-7	11954114	-
Arg Ala Ala	C ₂₅ H ₂₆ O ₂	6961-20-2	248015	-
Arg Arg Arg				
Arg Arg Val				
Arg Phe Arg				
Arginina, isoleucileucil-				
Ácido arginilglicilaspártico				
Asn Ala Tyr				
CAY10486				
Cisteína, metionilseril				
E-64d (Aloxistatina)				
Gln Phe Lys				

Glutationilpermidina	$C_{17}H_{34}N_6O_5S$	33932-35-3	440772	-
Glicina, glicilil-	$C_{10}H_{20}N_4O_4$	-	-	-
Glicilglicil-D, L-Fenilalanina	$C_{13}H_{17}N_3O_4$	74292-78-7	294564	-
His Gly Val	$C_{13}H_{21}N_5O_4$	-	-	-
His His Lys	$C_{18}H_{28}N_8O_4$	-	-	-
His Leu Val	$C_{17}H_{29}N_5O_4$	-	-	-
His Lys His	$C_{18}H_{28}N_8O_4$	-	-	-
Ile Glu Lys	$C_{17}H_{32}N_4O_6$	-	-	-
Ile Leu Leu	$C_{18}H_{35}N_3O_4$	-	-	-
Ile Met Ile	$C_{17}H_{33}N_3O_4S$	-	-	-
Ile Thr Arg	$C_{16}H_{32}N_6O_5$	-	-	-
Isoleucina, α - glutamilisoleucil-	$C_{17}H_{31}N_3O_6$	-	-	-
Isovalerilalanina	$C_8H_{15}NO_3$	68219-63-6	129285	-
L-Alaninamida, L-alanil-L- alanil-	$C_9H_{18}N_4O_3$	68762-26-5	7019944	-
Leu Arg His	$C_{18}H_{32}N_8O_4$	-	-	-
Leu Asp Lys	$C_{16}H_{30}N_4O_6$	-	-	-
Leu His Pro	$C_{17}H_{27}N_5O_4$	-	-	-
Leu Lys Thr	$C_{16}H_{32}N_4O_5$	-	-	-
Leu Met	$C_{11}H_{22}N_2O_3S$	-	-	-
Leucilarginina	$C_{12}H_{25}N_5O_3$	26607-15-8	152914	-
Éster metílico de L-leucil-L- leucina	$C_{13}H_{26}N_2O_3$	6491-83-4	-	-
L-ornitina	$C_5H_{12}N_2O_2$	3184-13-2	6262	-
Lys Asn Ser	$C_{13}H_{25}N_5O_6$	-	-	-
Lys Asp Leu	$C_{16}H_{30}N_4O_6$	-	-	-
Lys His His	$C_{18}H_{28}N_8O_4$	-	-	-
Lys Leu Val	$C_{17}H_{34}N_4O_4$	-	-	-
Lys Lys Thr	$C_{16}H_{33}N_5O_5$	-	-	-
Lys Met Thr	$C_{15}H_{30}N_4O_5S$	-	-	-
Lys Ser Lys	$C_{15}H_{31}N_5O_5$	-	-	-
Lys Ser Ser	$C_{12}H_{24}N_4O_6$	-	-	-
Lys Thr Trp	$C_{21}H_{31}N_5O_5$	-	-	-
Lys-Met-OH	$C_{16}H_{23}N_3O_6S$	-	-	-
Lisillisina	$C_{12}H_{26}N_4O_3$	13184-13-9	128837	-
Met Tyr Lys	$C_{20}H_{32}N_4O_5S$	-	-	-
N6-Hidroxi-L-lisina	$C_6H_{14}N_2O_3$	-	-	-
N-acetil-leu-leu-leu-tyr-amida	$C_{29}H_{47}N_5O_6$	-	443109	-
N-acetil-leu-leu-tyr	$C_{23}H_{35}N_3O_6$	-	-	-
N-Acetilysil-prolil- valinamida	$C_{16}H_{32}N_4O_3$	57899-96-4	6453546	-
N-estearoil histidina	$C_{24}H_{43}N_3O_3$	19132-64-0	152252	-
N-estarroil tirosina	$C_{27}H_{45}NO_4$	57993-25-6	6710116	-
O-Carbamoil-L-serina	$C_4H_8N_2O_4$	2105-23-9	439881	-
Fenilalanilleucina	$C_{15}H_{22}N_2O_3$	3303-55-7	76808	-
Pro Arg Lys	$C_{17}H_{33}N_7O_4$	-	-	-
Prolilserina	$C_8H_{14}N_2O_4$	-	7408258	-
Rodopeptina C1	$C_{25}H_{47}N_5O_4$	-	484985	-
Tirosilisoleucina	$C_{15}H_{22}N_2O_4$	-	7019110	-
Compostos organo- heterocíclicos				-
(S)-6-O- Metilnorlaudanosolina	$C_{17}H_{19}NO_4$	64710-33-4	182440	-
3-amino-fenciclidina	$C_{17}H_{26}N_2$	72242-00-3	10038154	-

Aeruginopeptina 228 ^a	C ₅₂ H ₆₈ N ₈ O ₁₅	-	23724561	-
Cromóforo deshidroxi-C-1027 aromatizado	C ₄₃ H ₄₄ ClN ₃ O ₁₂	-	5281920	-
Histidinol	C ₆ H ₁₁ N ₃ O	501-28-0	776	-
Nucleosídeos, nucleotídeos e análogos				
N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃	2002-35-9	168948	-
Ácidos orgânicos e derivados				
Aminopentamida	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O	60-46-8	22565	-
Metil-N-butirilglicina	C ₇ H ₁₃ NO ₃	52320-67-9	193872	-
N-Acetilcadaverina	C ₇ H ₁₆ N ₂ O	32343-73-0	189087	-
N-Acetilputrescina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O	5699-41-2	122356	-
Sacaropina	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₆	997-68-2	160556	-
Ácido ureidoglicólico	C ₃ H ₆ N ₂ O ₄	10346-27-7	336	-
Outros compostos orgânicos				
(S)-ACPA	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₅	-	447083	-
1- (Metilnitrosoamino) -4- (3-piridinil) -1,4-butanodiol	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₃	-	-	-
12,13 diHOME-(d4)	C ₁₈ H ₃₀ D ₄ O ₄	-	-	-
2'-hidroxibifenil-2-sulfonato	C ₁₂ H ₁₀ O ₃ S	77136-31-3	101365942	-
2-Metil-N- (6-undecanil) -3-piridinamina	C ₁₇ H ₃₀ N ₂	-	-	-
Glururoneto de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	25521-34-0	22833525	-
3 α , glucuronido de 5 α -tetra-hidronoretindrona	C ₂₆ H ₃₈ O ₈	-	-	-
4-(3,5-Difenilciclohexil) fenol	C ₂₄ H ₂₄ O	33330-65-3	-	-
4 α -peroxi-tetra-hidrobioterina	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₅	70110-58-6	129803	-
5,10-Metileno-H4SPT	C ₃₆ H ₅₂ N ₇ O ₁₉ P	-	72734293	-
Acetil-maltose	C ₁₄ H ₂₄ O ₁₂	-	11349616	-
Anandamida (20:1, n-9)	C ₂₂ H ₄₃ NO ₂	-	5283452	-
Citrulina n-butyl ester	C ₁₀ H ₂₁ N ₃ O ₃	2883-83-2	6426971	-
Dolichyl beta-D-glucosil fosfato	C ₃₁ H ₅₅ O ₉ P	220496-27-5	24892725	-
Helichrysetin 4,4'-di-O-alfa-glucoside	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	-	42607623	-
Ácido hialurônico	C ₂₈ H ₄₄ N ₂ O ₂₃	9004-61-9	24759	-
Inibidor de Cetoamida, 27	C ₂₅ H ₄₅ N ₅ O ₅	-	23647816	-
Espermina NONOate	C ₁₀ H ₂₆ N ₆ O ₂	136587-13-8	5259	-

Figura 4. Número de lipídios por categoria identificados por LC/MS. Os lipídios foram classificados de acordo com o LIPID MAPS (LIPID *Metabolites and Pathways Strategy*).



3.3.4 Análise das vias metabólicas

Os metabólitos identificados no FGA de carneiros estão envolvidos em 52 diferentes vias (Tabela 3). Doze vias foram significativamente enriquecidas ($p < 0,05$) nos metabólitos identificados (glicina, serina e treonina; biossíntese de pantotenato e CoA; metabolismo da galactose; metabolismo da arginina e prolina; metabolismo beta-alanina; metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; metabolismo da fenilalanina, biossíntese de aminoacil-tRNA, metabolismo da glutatona, metabolismo do glioxilato e do dicarboxilato, metabolismo do amido e da sacarose e metabolismo da taurina e hipotaurina. Seis vias apresentaram valor de impacto maior que 0,6: glicina, serina e treonina (0,68); metabolismo da fenilalanina (0,62); metabolismo da taurina e hipotaurina (0,75); a biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano (1,0); biossíntese da valina, leucina e isoleucina (0,66) e metabolismo do ácido linoleico (1,0).

Tabela 3 - Vias biológicas dos metabólitos do fluido das glândulas acessórias de carneiros. As vias metabólicas foram obtidas pelo MetaboAnalyst 3.0, que utiliza as vias da Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (KEGG).

Via	Total ^a	Hits ^b	Raw p^c	Holm p^d	Impacto ^e
Metabolismo da glicina, serina e treonina	32	10	0.0013902	0.11261	0.68562
Biossíntese de Pantotenato e CoA	15	6	0.0033424	0.26739	0.06123

Metabolismo da galactose	26	8	0.004735	0.37406	0.44746
Metabolismo da arginina e prolina	44	11	0.0057558	0.44895	0.47006
Metabolismo da beta-alanina	17	6	0.0068601	0.52822	0.57407
Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato	23	7	0.0087613	0.66586	0.51
Metabolismo da fenilalanina	9	4	0.011134	0.83505	0.62963
Biossíntese de aminoacil-tRNA	64	13	0.017257	1.0	0.14035
Metabolismo da glutatona	26	7	0.017732	1.0	0.08397
Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	16	5	0.02347	1.0	0.48149
Metabolismo de amido e sacarose	23	6	0.032149	1.0	0.14947
Metabolismo da taurina e hipotaurina	7	3	0.032162	1.0	0.75
Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano	4	2	0.061382	1.0	1.0
Metabolismo do nitrogênio	9	3	0.065543	1.0	0.0
Metabolismo da biotina	5	2	0.095074	1.0	0.4
Metabolismo da pirimidina	37	7	0.10006	1.0	0.15501
Biossíntese de valina, leucina and isoleucina	11	3	0.10955	1.0	0.66666
Metabolismo do ácido cianamino	6	2	0.13263	1.0	0.0
Via de fosfato de pentose	19	4	0.14503	1.0	0.35661
Metabolismo do butanoato	20	4	0.16672	1.0	0.10145
Ciclo do citrato (ciclo TCA)	20	4	0.16672	1.0	0.26517
Metabolismo de cisteína e metionina	28	5	0.18319	1.0	0.17245
Interconversões de pentose e glucuronato	15	3	0.22014	1.0	0.25
Metabolismo de ascorbato e aldarato	9	2	0.25722	1.0	0.4
Metabolismo do metano	9	2	0.25722	1.0	0.4
Biossíntese de ubiquinona e outra terpenoide-quinona	3	1	0.29349	1.0	0.0
Metabolismo de glicerolipídio	18	3	0.31326	1.0	0.41129
Metabolismo de purina	68	9	0.32123	1.0	0.0375
Metabolismo do propanoato	20	3	0.37623	1.0	0.0
Metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo	37	5	0.37968	1.0	0.26165
Metabolismo de esfingolipídio	21	3	0.40736	1.0	0.04261
Síntese e degradação de corpos cetônicos	5	1	0.43981	1.0	0.6
Metabolismo do ácido linoleico	5	1	0.43981	1.0	1.0
Metabolismo da histidina	14	2	0.46299	1.0	0.26619
Biossíntese de ácidos graxos insaturados	42	5	0.49265	1.0	0.0
Metabolismo da tiamina	7	1	0.55598	1.0	0.0
Degradação de leucina, valina e isoleucina	38	4	0.61117	1.0	0.0
Metabolismo dos glicerofosfolipídios	29	3	0.63038	1.0	0.07393
Metabolismo da frutose e manose	19	2	0.63225	1.0	0.06818
Metabolismo da vitamina B6	9	1	0.64819	1.0	0.07843
Metabolismo da tirosina	42	4	0.69154	1.0	0.2607
Metabolismo do piruvato	22	2	0.7123	1.0	0.20257

Glicólise ou Gliconeogênese	26	2	0.79598	1.0	0.09891
Metabolismo do ácido selenoamino	15	1	0.82537	1.0	0.0
Metabolismo de fosfato de inositol	28	2	0.8292	1.0	0.11163
Alongamento de ácidos graxos nas mitocôndrias	27	1	0.95739	1.0	0.0
Biossíntese de N-Glycano	35	1	0.98349	1.0	0.0
Biossíntese de esteroides	35	1	0.98349	1.0	0.05394
Biossíntese de ácidos graxos	38	1	0.98844	1.0	0.0
Metabolismo dos ácidos graxos	39	1	0.98974	1.0	0.0
Metabolismo do triptofano	41	1	0.99192	1.0	0.03054
Biossíntese de hormônios esteroides	67	2	0.9966	1.0	0.01776

^aTotal é o número total de compostos na via.

^bHits é o número correspondente dos dados enviados pelo usuário.

^cRaw p é o valor *p* original calculado a partir da análise de enriquecimento.

^dHolm p é o valor de *p* ajustado pelo método de Holm-Bonferroni.

^eImpacto é o valor de impacto da via calculado a partir da análise da topologia da via

3.4 Discussão

O presente estudo caracterizou, pela primeira vez, os metabólitos do fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova, utilizando duas abordagens metabolômicas complementares (GC/MS e LC/MS). As glândulas bulbouretrais, a próstata, as vesículas seminais e ampolas representam as glândulas sexuais acessórias que secretam a maior parte do fluido que compõe o sêmen de mamíferos (PRINS; LINDGREN, 2014). A função das glândulas sexuais acessórias está sob o controle da testosterona e das gonadotrofinas produzidas pelos testículos e hipófise anterior, respectivamente (MANN; PARSONS, 1950). Além disso, as secreções das glândulas sexuais masculinas atuam na proteção e fornecimento de energia e nutrientes para os espermatozoides, facilitando seu movimento ao longo do ducto ejaculatório e no trato genital feminino, assim contribuindo para o sucesso da fertilização (MANN, 1946; KANWAR et al., 1979; MOURA et al., 2006).

Os metabólitos são produtos finais das vias bioquímicas e a caracterização destas pequenas biomoléculas produzidas pelas glândulas sexuais acessórias de carneiros não tem sido extensivamente estudada. No presente estudo, as principais classes e vias metabólicas serão discutidas com foco nos metabólitos mais abundantes.

3.4.1 Identificação dos metabólitos por GC e LC/MS

Utilizando GC/MS e LC/MS foram identificados 371 metabólitos no FGA e alguns deles foram previamente descritos nas células espermáticas e plasma seminal de humanos (QIAO et al., 2017; PAIVA et al., 2015) e touros (VELHO et al., 2018). A GC/MS resultou na identificação de menos compostos em comparação com a LC, isto se deve ao fato de que a LC não é limitada pela necessidade de separação de moléculas voláteis termicamente estáveis ou metabólitos maiores (ISSAQ et al., 2008). Por outro lado, a GC apresentou maior diversidade de compostos, identificando aqueles pertencentes a nove diferentes classes. Apenas um único metabólito foi identificado pelas duas técnicas, destacando a importância da utilização de dois métodos para a obtenção de uma visão mais abrangente do metaboloma de amostras biológicas complexas como o fluido das glândulas acessórias.

Um total de 127 moléculas lipídicas foi identificado em nosso estudo, tornando estas os principais componentes do FGA. A LC/MS permitiu a identificação de 102, enquanto a GC/MS identificou apenas 25 lipídios. A GC é limitada a compostos voláteis e os lipídios têm baixa volatilidade e, na maioria das circunstâncias, apenas a composição de ácidos graxos de toda a amostra é definida. Isto é conseguido após a hidrólise dos lipídios e a derivatização dos ácidos graxos livres para melhorar sua volatilidade (CHAPMAN, 1993). A categoria predominante de lipídios detectada no FGA pela GC foi ácidos graxos e os glicerofosfolipídios foram os principais lipídios detectados por LC/MS. Quarenta e cinco compostos pertencentes à classe de aminoácidos, peptídeos e análogos foram identificados por GC/MS e 58 por LC. Vários triptídeos e dipeptídeos detectados por LC/MS os quais provavelmente resultaram da quebra de proteínas. Em nosso estudo, a GC/MS foi mais eficiente na detecção de carboidratos. A GC/MS apresenta alta resolução e sensibilidade e, além disso, a LC pode não ser tão adequada para a separação de carboidratos. Uma baixa concentração de açúcares detectada por HPLC está provavelmente associada à recuperação não quantitativa devido à absorção de açúcares na fase estacionária (OLIVER et al., 2013).

3.4.2 Principais classes de metabólitos do fluido das glândulas acessórias

- ***Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios***

Várias partículas microscópicas, como corpos e grânulos lipídicos, são encontradas no sêmen. Estas partículas também são detectadas em ejaculados de indivíduos

vasectomizados, mostrando que derivam das secreções das glândulas sexuais acessórias (MANN, 1974). Lipídios são constituintes básicos do sêmen que representam parte da membrana espermática e desempenham papéis no metabolismo, motilidade, viabilidade (SCOTT, 1973), capacitação espermática e fertilização (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). As categorias predominantes de lipídios detectada em nosso estudo foram ácidos graxos e glicerofosfolipídios. Dentre os ácidos graxos, o ácido esteárico, o beta-hidroxi-isovalerato, o ácido palmítico e itacônico foram os mais abundantes. Os ácidos graxos podem ser usados como fonte de energia durante a escassez de substratos glicolíticos (HARTREE; MANN, 1961), e são encontrados em altas concentrações no plasma seminal de touros (KELSO et al., 1997). Além disso, estudos mostraram que os ácidos graxos estão associados positivamente à atividade antioxidante do plasma seminal (SAFARINEJAD et al., 2010).

Glicerofosfolipídios, incluindo fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, foram outra categoria abundante de lipídios no FGA de carneiros. Os glicerofosfolipídios são os principais constituintes das membranas biológicas e sua presença nas amostras do FGA é provavelmente o resultado da apoptose celular, durante esse processo a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina tornam-se externalizadas na superfície celular (CAMARGO et al., 2014). Além disso, vários componentes micro e macromoleculares do fluido das glândulas acessórias são o resultado da descamação ou ruptura de células secretoras durante sua atividade secretora regular (MANN; PARSONS, 1950). Ambas fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina detectadas no fluido das glândulas acessórias são encontradas em estruturas vesiculares semelhantes aos prostassomas, que estão presentes no plasma seminal de carneiros (BREITBART; RUBINSTEIN, 1982). A fosfatidilserina está envolvida em vias de sinalização e atua como um cofator enzimático, além de ser precursora das fosfatidiletanolaminas (VANCE; STEENBERGEN, 2005). A fosfatidiletanolamina, por sua vez, foi detectada no plasma seminal de equinos e está envolvida na proteção dos espermatozoides durante sua passagem ao longo do trato genital feminino (WOOD et al., 2016).

As prostaglandinas também foram detectadas no FGA de carneiros e estes compostos foram previamente relatados em altas concentrações no sêmen de ovinos (DIMOV; GEORGIEV, 1977). A biossíntese de prostaglandinas em carneiros ocorre em microssomas da mucosa da ampola, ducto deferente e glândulas vesiculares (OLIW et al., 1986). As prostaglandinas têm atividade imunossupressora (KELLY, 1997) e promovem o transporte do espermatozoide estimulando o músculo liso do trato genital masculino e feminino (HAWK, 1983). Os esteroides são uma categoria importante de lipídios e, entre eles, o colesterol foi o

lipídio mais abundante no FGA de carneiros. O colesterol pode ser utilizado para a proteção da integridade da membrana espermática, contribuindo para a qualidade do espermatozoide (BEER-LJUBIC et al., 2009). O tratamento de espermatozoides de equinos com colesterol antes da criopreservação aumentou a porcentagem da viabilidade pós-descongelamento e o número de células espermáticas que se ligam à zona pelúcida (MOORE et al., 2005).

Vários metabólitos derivados da vitamina D3 foram detectados no FGA de carneiros. A presença do receptor da vitamina D e das enzimas metabolizadoras nas vesículas seminais de humanos confirma que a vitamina D é metabolizada nas glândulas vesiculares (BLOMBERG JENSEN et al., 2010). A vitamina D é importante para o controle do ciclo celular, reabsorção de cálcio e transporte intracelular (KUMAR et al., 1994), e pode estar envolvida no crescimento e diferenciação do tecido das glândulas sexuais acessórias.

- ***Aminoácidos, peptídeos e análogos***

Os aminoácidos secretados pelas glândulas sexuais acessórias contribuem para a atividade metabólica dos espermatozoides (PATEL et al., 1998), aumentam a sobrevivência espermática e fornecem uma condição adequada para a síntese de ácidos nucleicos (SETCHELL et al., 1967). Eles também funcionam como agentes quelantes e tampão, protegendo as células espermáticas (SHIVAJI et al., 1990). Os aminoácidos mais abundantes no FGA de carneiros foram alanina, leucina, valina, 3-clorotirosina, O-carbamoil-L-serina, L-alotreonina e o ácido arginilglicilaspártico (RGD). Alanina, leucina e valina fazem parte da composição de aminoácidos do inibidor seminal do transporte de cálcio. Juntos eles modificam o transporte ativo de cálcio através da membrana espermática, causando um atraso na absorção de cálcio pelos espermatozoides ejaculados (RUFO et al., 1982). Além disso, a leucina tem sido associada à fertilização no plasma seminal bovino (KUMAR et al., 2015), e níveis reduzidos de alanina foram detectados no plasma seminal de homens inférteis (GERSHBEIN; THIELEN, 1988). O RGD está associado à adesão e interação celular (D'SOUZA et al., 1991). Em hamsters e humanos, o RGD está envolvido na adesão do espermatozoide ao oolema e na penetração do óvulo (Bronson e Fusi, 1990). De fato, acredita-se que a osteopontina, uma das proteínas do plasma seminal de touros associadas à fertilidade (CANCEL et al., 1997; MOURA et al., 2006), afeta a fertilização por interação com as integrinas dos espermatozoides e oócitos através do domínio RGD (MOURA, 2005).

O aminoácido modificado 3-clorotirosina é um marcador da atividade da mieloperoxidase, uma enzima que atua em processos oxidativos e antimicrobianos (HAZEN

et al., 1997) e está envolvida na remoção de células apoptóticas (LESSIG et al., 2007). A detecção do aminoácido 3-clorotirosina no fluido da glândula acessória indica a presença de mecanismos de defesa imunológicos e anti-inflamatórios. O-carbamoil-L-serina é um substrato da carbamoil-serina amônia-liase, uma enzima que catalisa o O-carbamoil-L-serina para o piruvato durante a desaminação de aminoácidos (COOPER; MEISTER, 1973). A L-alotreonina é o substrato da enzima serina hidroximetiltransferase que catalisa a L-alotreonina à glicina (SCHIRCH; GROSS, 1968), outro metabólito detectado no fluido das glândulas acessórias o qual está associado à síntese de bases de purinas e pirimidinas (BUCHANAN, 1960).

- *Carboidratos e seus conjugados*

Nossa abordagem permitiu a identificação de álcoois de açúcar, como D-sorbitol, ribitol, xilitol e mio-inositol, ácidos de açúcar (ácido glicérico, ácido glicônico e ácido 3-fosfoglicérico), monossacarídeos (L-sorbose, DL-gliceraldeído, 2-desoxi-D-ribose e D-(+)-galactose, dissacarídeos (lactose, maltose e D -(+)-trealose), dentre outros. O glicerol é produzido em quantidades consideráveis pelas glândulas sexuais acessórias de humanos (FRENKEL et al., 1974), ele também está presente no plasma seminal de touros (VELHO et al., 2018), e em nosso estudo foi abundante no FGA de carneiros. Em touros e carneiros, o glicerol demonstrou interagir com os espermatozoides. Ele é metabolizado e convertido em fontes adicionais de energia, como a frutose e o ácido láctico que são utilizados pelos espermatozoides durante a fertilização (MOHRI; MASAKI, 1967; MANN; WHITE, 1957). Vesículas seminais são a principal fonte de frutose em touros e humanos e há duas principais vias metabólicas para a biossíntese de frutose nestas glândulas. A primeira compreende a conversão da glicose sanguínea em frutose seminal e a segunda utiliza uma via não fosforilativa para a conversão de glicose em frutose via sorbitol, em vesículas seminais de humanos, touros e carneiros (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). As enzimas glicolíticas espermáticas convertem a frutose seminal em ácido láctico, fornecendo energia para manter a motilidade e a sobrevivência das células espermáticas (MANN, 1946; WHO, 1992).

O sorbitol é um importante poliol e, como a frutose, fornece energia metabólica para os espermatozoides (KING; MANN, 1959). A via do poliol ocorre nas glândulas sexuais acessórias e foi demonstrado que o sorbitol é sintetizado pelas vesículas seminais dos carneiros a partir da glicose sob a ação da aldose redutase (HERS, 1960). Outros álcoois de açúcar abundantes presentes no FGA de carneiros incluem D-manitol e D-treitol, que servem

como substratos para a enzima sorbitol desidrogenase que catalisa a conversão de polióis em frutose (LINDSTAD et al., 1998). Além disso, a motilidade de espermatozoides bovinos frescos e pós-descongelados tratados com tampões contendo glicose, galactose, ribose, xilose e arabinose ou seus correspondentes álcoois de açúcar foi significativamente maior em relação aos parâmetros de espermatozoides tratados com diluidores sem açúcar (GARCIA; GRAHAM, 1989).

- *Outros metabólitos*

O ácido cítrico e o ácido L-(+)-lático também foram metabólitos abundantes detectados no FGA. O ácido cítrico é o principal ácido orgânico do plasma seminal e tem sido associado ao processo de coagulação do sêmen em algumas espécies. O ácido cítrico é secretado pela próstata e vesículas seminais de humanos (HUMPHREY; MANN, 1949), e possivelmente o ácido cítrico é utilizado pelas glândulas sexuais acessórias como fonte de energia ou acetil CoA citosólico para a síntese de ácidos graxos (COSTELLO; FRANKLIN, 1991). O ácido lático é o produto final do ciclo de fermentação glicolítica e as vesículas seminais são capazes de metabolizar frutose e glicose em ácido lático (MANN; LUTWAKMAN, 1946). Putrescina e espermina também são metabólitos importantes que pertencem ao grupo de compostos nitrogenados orgânicos. A putrescina é precursora da espermina e ambas poliaminas podem atuar como reguladores intracelulares de vários processos fisiológicos (IGARASHI et al., 2010). Em particular, as poliaminas são mediadoras da ação de hormônios esteroides no trato genital masculino (WILLIAMS-ASHMAN; LOCKWOOD, 1970), assim a putrescina e a espermina podem ter efeitos fisiológicos na capacidade de secreção e crescimento das glândulas sexuais acessórias.

O ácido ascórbico, identificado em nosso estudo, tem um papel relevante na reprodução animal. Esta molécula está associada à biossíntese de esteroides e hormônios peptídicos e atua como um dos principais agentes antioxidantes no plasma seminal, protegendo os espermatozoides contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (COLAGAR; MARZONY, 2009). Nucleotídeos e nucleosídeos como inosina, adenosina, guanosina, citidina-5'-monofosfato e o monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) foram detectados por GC/MS no FGA de carneiros. Estudos têm demonstrado que o cGMP influencia a manutenção da função regular dos tecidos reprodutivos, pois estimula várias respostas celulares e teciduais, bem como a função do músculo liso das vesículas seminais (UCKERT et al., 2007).

3.4.3 Vias metabólicas associadas aos metabólitos do fluido das glândulas acessórias

As principais vias dos metabólitos encontradas no fluido das glândulas acessórias foram o metabolismo da glicina, serina e treonina; metabolismo da fenilalanina; metabolismo da taurina e hipotaurina; biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano; biossíntese de valina, leucina e isoleucina; e metabolismo do ácido linoleico. O metabolismo da glicina, serina e treonina é importante para a fosforilação de proteínas e síntese de cisteína, purina, pirimidina e fosfatidilserina (WU, 2009). O metabolismo destes aminoácidos pode contribuir para o crescimento e proliferação celular no tecido das glândulas sexuais acessórias. O metabolismo da taurina e da hipotaurina é uma via importante no trato genital masculino. O epitélio das glândulas acessórias sintetiza e secreta taurina pela via descarboxilase sulfonato de cisteína (FAN et al., 2009). O ácido sulfídrico de cisteína (CSA) é oxidado pela cisteína dioxigenase, após o CSA é descarboxilado pela decarboxilase de sulfonato de cisteína produzindo hipotaurina, que é oxidada em taurina (DO; TAPPAZ, 1996). Hipotaurina e taurina nas secreções genitais têm efeitos positivos sobre as células espermáticas, pois atuam como agentes antioxidantes (ARUOMA et al., 1988), melhoram a motilidade e a capacitação espermática (BOATMAN et al., 1990), fertilização e desenvolvimento inicial do embrião em hamsters (BARNETT; BAVISTER, 1992). As funções precisas da hipotaurina e da taurina nas glândulas sexuais acessórias masculinas permanecem desconhecidas, mas é possível que esses aminoácidos estejam envolvidos na osmorregulação e na inibição do estresse oxidativo.

A biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano faz parte de outras vias importantes, pois servem como precursores para a síntese de neurotransmissores. Os neurotransmissores catecolaminérgicos requerem tirosina para sua síntese, que pode ser obtida a partir da fenilalanina. Além disso, a fenilalanina e a tirosina podem influenciar a secreção de gonadotrofinas em ovinos (WEINER; GANONG, 1978; BLACHE et al., 2000). O metabolismo da fenilalanina é importante para as glândulas sexuais acessórias porque ela pode ser incorporada nas proteínas celulares, convertida em ácido fenilpirúvico ou convertida em tirosina. Além disso, a fenilalanina regula a atividade da piruvato quinase, uma enzima da via glicolítica das glândulas sexuais acessórias de ratos (VIJAYVARGIYA et al., 1969).

A biossíntese de valina, leucina e isoleucina também é outra importante via. Estes aminoácidos estão envolvidos na síntese de glutamina e alanina, regulação da síntese e estrutura de proteínas (BROSNAN; BROSNAN, 2006). Como mencionado anteriormente, a valina, a isoleucina e a leucina estão envolvidas na regulação do cálcio, que influencia na motilidade, capacitação e reação acrossômica de espermatozoides humanos (KUMAR et al.,

2015). O metabolismo do ácido linoleico é outra importante via. Durante o metabolismo do ácido linoleico, este ácido graxo é convertido em ácido gama-linolênico que é transformado em ácido di-homo-gama-linolênico e depois convertido em ácido araquidônico (NUGTEREN et al., 1985). O ácido araquidônico é metabolizado em prostaglandinas pela enzima ciclo-oxigenase nas vesículas seminais de carneiros (COTTEE et al., 1977). As prostaglandinas aumentam as contrações do músculo liso do trato genital masculino e feminino, e assim promovem o transporte dos espermatozoides.

3.5 Conclusão

O uso combinado da LC/MS e GC/MS foi essencial para a obtenção de uma visão ampla dos metabólitos presentes na secreção das glândulas sexuais acessórias de carneiros, uma vez que apenas um metabólito foi detectado por ambos os métodos. A maioria dos compostos identificados no FGA eram lipídios, aminoácidos e carboidratos. Os metabólitos detectados no FGA são moduladores da função espermática e da fertilidade masculina, o que indica que a análise química do fluido das glândulas sexuais acessórias é valiosa para melhor entender a reprodução animal e para investigar possíveis biomarcadores da fertilidade.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

No presente estudo foram identificadas centenas de moléculas nos fluidos reprodutivos e espermatozoides de carneiros por meio das tecnologias “ômicas”. As secreções do trato genital de carneiros contribuem com uma diversidade funcional de proteínas e metabólitos para a composição do plasma seminal. Estes compostos estão associados com a viabilidade, proteção, transporte, fornecimento de energia, e fertilidade das células espermáticas. Tais compostos também estão envolvidos na função das glândulas sexuais acessórias. Algumas proteínas interagem com os espermatozoides durante a passagem pelos epidídimos e na ejaculação determinando importantes modificações nas membranas espermáticas que contribuirão para o sucesso da fertilização.

Assim, a caracterização das biomoléculas presentes nas secreções do trato genital é importante para determinar o potencial reprodutivo de carneiros e aprimorar as biotécnicas da reprodução. Através da proteômica e da metabolômica, é possível identificar componentes que podem ser utilizados no diagnóstico da fertilidade e de doenças que acometem o sistema reprodutor masculino. Além disso, determinadas moléculas podem ser utilizadas em associação a crioprotetores e diluidores com a finalidade de melhorar o processo de criopreservação e aumentar as taxa de fertilidade pós-inseminação artificial.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-DIBARRAT, J.; TENORIO-GUTIÉRREZ, V.; SORIANO-VARGAS, E.; TALAVERA-ROJAS, M.; CAL-PEREYRA, L.; MONTES DE OCA, J. R., VELÁZQUEZ-ORDOÑEZ, V.; TÓRTORA-PÉREZ, J. Distribution of lymphocytes, immunoglobulin-containing cells, macrophages, and dendritic cells in the accessory sex glands of rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 363-372, 2016.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1129-1136, 1983.
- ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J.; SIKKA, S. C. Antioxidant potential of human serum albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 4, p. 412-419, 1998.
- ATZORI, L.; ANTONUCCI, R.; BARBERINI, L.; GRIFFIN, J. L.; FANOS, V. Metabolomics: a new tool for the neonatologist. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 22, p. 50-53, 2009.
- BARNETT, D. K.; BAVISTER, B. D. Hypotaaurine requirement for in vitro development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from in vitro-fertilized ova. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 2, p. 297-304, 1992.
- BEER-LJUBIĆ, B.; ALADROVIĆ, J.; MARENJAK, T. S.; LASKAJ, R.; MAJIĆ-BALIĆ, I.; MILINKOVIĆ-TUR, S. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. **Theriogenology**, v. 72, n. 8, p. 1132–1140, 2009.
- BERGERON A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 4, p. 461-470, 2005.
- BLACHE, D.; CHAGAS, L. M.; BLACKBERRY, M. A.; VERCOE, P. E.; MARTIN, G. B. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 1, p. 1–11, 2000.
- BLOMBERG JENSEN, M.; NIELSEN, J. E.; JORGENSEN, A.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; KRISTENSEN, D. M.; JORGENSEN, N. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Human Reproduction**, v. 25, n. 5, p.1303-1311, 2010.
- BOATMAN, D. E.; BAVISTER, B. D.; CRUZ, E. Addition of hypotaaurine can reactivate immotile golden hamster spermatozoa. **Andrology**, v. 11, n. 1, p. 66-72, 1990.
- BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S. Characterization of Mg²⁺- and Ca²⁺-ATPase activity in membrane vesicles from ejaculated ram seminal plasma. **Archives of Andrology**, v. 9, n. 2, p. 147–157, 1992.

- BROMFIELD, J. J.; SCHJENKEN, J. E.; CHIN, P. Y.; CARE, A. S.; JASPER, M. J.; ROBERTSON, S. A. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 111, n. 6, p. 2200–2205, 2014.
- BRONSON, R. A.; FUSI, F. Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 6, p. 1019-1025, 1990.
- BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. **Journal of Nutrition**, 136, 207-211, 2006.
- BUCHANAN, J. M. (1960). Biosynthesis of purine nucleotides, in: **The Nucleic Acids**, (Vol.3). Elsevier, 2012.
- CAMARGO, M.; INTASQUI, P.; LIMA, C. B.; MONTANI, D. A.; NICHI, M.; PILAU, E. J.; GOZZO, F. C.; TURCO, E. G.; BERTOLLA, R. P. MALDI-TOF fingerprinting of seminal plasma lipids in the study of human male infertility. **Lipids**, v. 49, n. 9, p. 943-956, 2014.
- CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1293-1301, 1997.
- CASTELLON, E. A.; BALBONTIN J. B.; HUIDOBRO, C. C. Secretion of glycosidases in human epididymal cell cultures. **Archives of Andrology**, v. 45, n.1, p. 35-42, 2000.
- CHACE, D.H. Mass spectrometry in the clinical laboratory. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 445-477, 2001.
- CHAPMAN, J. R. Practical Organic Mass Spectrometry - A Guide for Chemical and Biochemical Analysis (2nd ed.). John Wiley & Sons, 1993.
- CHENG, G.; LI, J.; LI, F., WANG, H.; SHI, G. Human ribonuclease 9, a member of ribonuclease A superfamily, specifically expressed in epididymis, is a novel sperm-binding protein. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, n. 2, p. 240-251, 2009.
- CIORNEI, C. D.; EGESTEN, A.; ENGSTRÖM, M.; TÖRNEBRANDT, K.; BODELSSON, M. Bactericidal/permeability-increasing protein inhibits endotoxin-induced vascular nitric oxide synthesis. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 46, n. 9, p. 1111–1118, 2002.
- COLAGAR, A. H.; MARZONY, E. T. Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 144–149, 2009.
- COOPER, A. J. L.; MEISTER, A. Enzymatic conversion of O-carbamyl-L-serine to pyruvate and ammonia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 55, n. 3, p. 780-787, 1973.
- COSSON, J. ATP, the sperm movement energizer. In: **Adenosine Triphosphate: Chemical Properties, Biosynthesis and Functions in Cells**. Nova Publisher Inc, USA, 2012, pp. 1–46.

COSTELLO, L. C.; FRANKLIN, R. B. Concepts of citrate production and secretion by prostate: 1. Metabolic relationships. **The Prostate**, v. 18, n. 1, p. 25-46, 1991.

COTTEE, F.; FLOWER, R. J.; MONCADA, S.; SALMON, J. A.; VANE, J. R. Synthesis of 6-keto-PGF 1α by ram seminal vesicle microsomes. **Prostaglandins**, v. 14, n. 3, p. 413-423, 1977.

D'SOUZA, S. E.; GINSBERG, M. H.; PLOW, E. F. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, p. 246-250. 1991.

DACHEUX J. L.; CASTELLA, S.; GATTI. J. L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 319-341, 2005.

DACHEUX, J. L.; BELLEANNEE, C.; JONES, R.; LABAS, V.; BELGHAZI, M.; GUYONNET, B.; DRUART, X., GATTI. J. L., DACHEUX, F. Mammalian epididymal proteome. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 306, n. 1-2, p. 45-50, 2009.

DACHEUX, J. L.; DRUART, X.; FOUCHECOURT, S.; SYNTIN, P.; GATTI, J. L.; OKAMURA, N.; DACHEUX, F. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 53, p. 99-107, 1998.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, 2003.

DEVENISH, R. J.; PRESCOTT, M.; RODGERS, A. J. The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 267, p. 1-58, 2008.

DIMOV, V.; GEORGIEV, G. Ram semen prostaglandin concentration and its effect on fertility. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 1050-1054, 1977.

DO K. Q.; TAPPAZ, M. L. Specificity of cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) for sulfur-containing amino acids. **Neurochemistry International**, v. 28, n. 4, p. 363-371, 1996.

EGEA, R. R.; PUCHALT, N. G.; ESCRIVÁ, M. M.; VARGHESE, A. C. OMICS: current and future perspectives in reproductive medicine and technology. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 7, n. 2, p. 73-92, 2014.

EVANS, J. P. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. **Frontiers in Bioscience**, v. 15, n. 4, p. 114-31, 1999.

FACÓ, O.; PAIVA, S. R.; ALVES, L. R. N.; LÔBO, R. N. B.; VILLELA, L. C. V. **Raça Morada Nova: origem, características e perspectivas** (1ªed.). Sobral: Embrapa Caprinos, 2008.

FAN, J. J.; ZHOU, J. L.; LI, J. H.; CUI, S. Accessory sex glands of male mice have the ability

to synthesize taurine via the cysteine sulfinic acid decarboxylase pathway. **Cell Biology International**, v. 33, n. 6, p. 684-689, 2009.

FLORMAN, H. M., DUCIBELLA T. Fertilization in mammals. In: **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3rd ed. New York: Elsevier Inc., 2006. p. 55–112.

FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: structure and function. **Biochemical Journal**, v.318, p.1-14, 1996.

FOUCHÉCOURT, S.; LAREYRE, J. J.; CHAURAND, P.; DAGUE, B. B.; SUZUKI, K.; ONG, D. E.; OLSON, G. E.; MATUSIK, R. J. et al. Identification, Immunolocalization, Regulation, and Postnatal Development of the Lipocalin EP17 (Epididymal Protein of 17 Kilodaltons) in the Mouse and Rat Epididymis. *Endocrinology*, v.144, n. 3, p.887–900, 2003.

FRENKEL, G.; PETERSON, R. N.; DAVIS, J. E.; FREUND, M. Glycerylphosphorylcholine and carnitine in normal human semen and in postvasectomy semen: differences in concentrations. **Fertility and Sterility**, v. 25, n. 1, p. 84-87, 1974.

GARCIA, M. A.; GRAHAM, E. F. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effect of sugars and sugar alcohols on postthaw motility. **Theriogenology**, v. 31, n. 5, p. 1029-1037, 1989.

GERSHBEIN, L. L.; THIELEN, D. R. Enzymatic and electrolytic profiles of human semen. **The Prostate**, v. 12, n. 3, p. 263–269, 1988.

GHISONI, G.; CHIODELLI, G.; ROCCHETTI, G.; KANE, D.; LUCINI, L. UHPLC-ESI-QTOF-MS screening of lignans and other phenolics in dry seeds for human consumption. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 229-236, 2017.

GILANY, K.; MANI-VARNOSFADERANI, A.; MINAI-TEHRANI, A.; MIRZAJANI, F.; GHASSEMPOUR, A.; SADEGHI, M. R.; AMINI, M.; REZADOOST, H. Untargeted metabolomic profiling of seminal plasma in nonobstructive azoospermia men: A noninvasive detection of spermatogenesis. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 8, p. 1-10, 2017.

GLANDER, H. J.; KRATZSCH, J.; WEISBRICH, C.; BIRKENMEIER, G. Insulin-like growth factor-I and α_2 -macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. **Human Reproduction**, v. 11, n. 11, p. 2454-2460, 1996.

HALL, J. C.; KILLIAN, G. J. Changes in rat sperm membrane glycosidase activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. **Biology of Reproduction**, v. 36, n. 3, p. 709-718, 1987.

HARTREE, E. F.; MANN, T. Phospholipids in ram semen: metabolism of plasmalogen and fatty acids. **Biochemical Journal**, v. 80, n. 3, p. 464–476, 1961.

HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2645-2660. 1983.

HAZEN, S. L.; CROWLEY, J. R.; MUELLER, D. M.; HEINECKE, J. W. Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive and

specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 6, p. 909–916, 1997.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J.; KAVANAUGH, J. F.; GRIEL, L. C. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 2, p. 390–397, 1995.

HERRERO, M. B.; MANDAL, A.; DIGILIO, L. C.; COONROD, S. A.; MAIER, B.; HERR, J. C. Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm–egg binding and fertilization. *Developmental Biology*, v. 284, n. 1, p. 126–142, 2005.

HERS, H. G. The mechanism of the formation of seminal fructose and fetal fructose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 37, p. 127-138, 1960.

HUANG, Z.; KHATRA, B.; BOLLEN, M.; CARR, D. W.; VIJAYARAGHAVAN, S. Sperm PP1 γ 2 is regulated by a homologue of the yeast protein phosphatase binding protein sds22. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1936–1942, 2002.

HUMPHREY, G. F.; MANN, T. Studies on the metabolism of semen. 5. Citric acid in semen. **Biochemistry Journal**, v. 44, p. 97-105, 1949.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 1, p. 39–51. 2010.

ISSAQ, H. J.; ABBOTT, E.; VEENSTRA, T. D. Utility of separation science in metabolomics studies. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 11, p. 1936-1947, 2008.

JIANG, H. Y., O, W. S., LEE, K. H., TANG, P. L., CHOW, P. H. Ablation of paternal accessory sex glands is detrimental to embryo development during implantation. **Anatomy and Embryology**, v. 203, n. 4, p. 255–263, 2001.

JOHNSON, J. D.; MEHUS, J. G.; TEWS, K.; MILAVETZ, B. I.; LAMBETH, D. O. Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 42, p. 27580–27586, 1998.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, p. 536-51, 2012.

KANWAR, K. C.; YANAGIMACHI, R.; LOPATA, A. Effects of human seminal plasma on the fertilizing capacity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 31, n. 3, p. 321–327. 1979.

KELLY, R. W. Prostaglandins in primate semen: biasing the immune system to benefit spermatozoa and virus? **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 57, n. 2, p. 113-118, 1997.

KELLY, V. C.; KUY, S.; PALMER, D. J.; XU, Z.; DAVIS, S. R.; COOPER, G. J. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5826-5833, 2006.

KELSO, K. A., REDPATH, A., NOBLE, R. C., SPEAKE, B. K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 1-6, 1997.

KING, T. E.; MANN, T. Sorbitol metabolism in spermatozoa. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 151, n. 943, p. 226–243, 1959.

KOBAYASHI, T.; KANEKO, T.; IUCHI, Y.; MATSUKI, S.; TAKAHASHI, M.; SASAGAWA, I.; NAKADA, T.; FUJII, J. Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in male reproductive systems, accessory glands, and spermatozoa of rats. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 5, p. 674-683, 2002.

KOEK, M. M.; JELLEMA, R. H.; VAN DER GREEF, J.; TAS, A. C.; HANKEMEIER, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 307–328, 2011.

KUMAR, A.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P.; ANZAR, M. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: 1H nuclear magnetic resonance analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n.2, p. 123–131, 2015.

KUMAR, R., SCHAEFER, J.; GRANDE, J. P.; ROCHE, P. C. Immunolocalization of calcitriol receptor, 24-hydroxylase cytochrome P-450, and calbindin D28k in human kidney. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. F477-F485, 1994.

LESSIG, J.; SPALTEHOLZ, H.; REIBETANZ, U.; SALAVEI, P.; FISCHLECHNER, M.; GLANDER, H. J.; ARNHOLD, J. Myeloperoxidase binds to non-vital spermatozoa on phosphatidylserine epitopes. **Apoptosis**, v. 12, n. 10, p. 1803–1812, 2007.

LI, K.; XUE, Y.; CHEN, A.; JIANG, Y.; XIE, H.; SHI, Q.; ZHANG, S.; NI, Y. Heat shock protein 90 has roles in intracellular calcium homeostasis, protein tyrosine phosphorylation regulation, and progesterone-responsive sperm function in human sperm. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e115841, 2014.

LIAO, T-T.; XIANG, Z.; ZHU, W-B.; FAN L-Q. Proteome analysis of round-headed and normal spermatozoa by 2-D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. **Asian Journal of Andrology**, v. 11, n. 6, p. 683–693, 2009.

LINDSTAD, R. I.; KÖLL, P.; MCKINLEY-MCKEE, J. S. Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 330, p. 479-487, 1998.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: a primer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 274–284, 2017.

LÓPEZ-PÉREZ, A; PÉREZ-CLARIGET, R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5°C for 24 hours. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 395–399, 2012.

LUNA, C.; COLÁS, C.; CASAO, A.; SERRANO, E.; DOMINGO, J.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Ram seminal plasma proteins contribute to

sperm capacitation and modulate sperm–zona pellucida interaction. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 670-678, 2014.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, n. 1-2, p. 109-119, 2002.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, n. 1, p. 179-188, 1974.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. **Biochemical Journal**, v. 40, n. 4, p. 48–491, 1946.

MANN, T. **The Biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. (2^a ed.). London: Methuen & Go Ltd. New York: John Wiley & Sons Inc., 1964.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. In: **Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1981, p. 495.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. In: **Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology** (1st ed.). Springer-Verlag London, 1981.

MANN, T.; PARSONS, U. Studies on the metabolism of semen. 6. Role of hormones. Effect of castration, hypophysectomy and diabetes. Relation between blood glucose and seminal fructose. **Biochemical Journal**, v. 46, n. 4, p. 440–450, 1950.

MANN, T.; WHITE, I. G. Glycerol Metabolism by Spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 65, n. 4, p. 634–639, 1957.

MARQUES, V. A.; GOULART, L. R.; FELICIANO SILVA, A. E. D. Variations of protein profiles and calcium and phospholipase A2 concentrations in thawed bovine semen and their relation to acrosome reaction. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 825-829, 2000.

MARTINS, J. A. M.; SOUZA, C. E. A.; SILVA, F. D. A.; CADAVID, V. G.; NOGUEIRA, F. C.; DOMONT, G. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOURA, A. A. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 115–127, 2013.

MASTRANGELO, A.; FERRARINI, A.; REY-STOLLE, F.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 900, p. 21-35, 2015

MAXWELL, W. M. C.; DE GRAAF, S. P.; EL-HAJJ GHAOUI, R.; EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. In: JUENGEL, J. I.; MURRAY, F., SMITH, F. (eds), **Reproduction in Domestic Ruminants VI**, Vol. 64. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 13– 37, 2007.

MIKI, K.; QU, W.; GOULDING, E. H.; WILLIS, W. D.; BUNCH, D. O.; STRADER, L. F.; PERREAULT, S. D.; EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male

fertility. **PNAS**, v. 101, n. 47, p. 16501-16506, 2004.

MOHRI, H.; MASAKI, J. Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 14, n. 2, p. 179–194, 1967.

MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; DELLAQUA, J. A. Jr, MELO, C. M.; MAZIERO, R. R. D.; AVANZI, B. R.; ALVARENGA, M. A.; GUASTI, P. N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.127, n. 3-4, p. 197-201, 2011.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, n. 3, p. 241–249, 2005.

MOURA, A. A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2005.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201–211, 2006.

NUGTEREN, D. H.; CHRIST-HAZELHOF, E.; VAN DER BEEK, A.; HOUTSMULLER, U. M. Metabolism of linoleic acid and other essential fatty acids in the epidermis of the rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 834, n. 3, p. 429-436, 1985.

O, W. S., CHEN, H. Q., & CHOW, P. H. Effects of male accessory sex gland secretions on early embryonic development in the golden hamster. **Reproduction**, v. 84, n. 1, p. 341–344, 1988.

OHKUBO, I.; TADA, T.; OCHIAI, Y.; UEYAMA, H.; EIMOTO, T.; SASAKI, M. Human seminal plasma β -microseminoprotein: Its purification, characterization, and immunohistochemical localization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 6, p. 603–611, 1995.

OLIVEIRA, C. H.; SILVA, A. M., SILVA, M.; VAN TILBURG, M. F.; FERNANDES, C. C., MOURA; A. A. et al. Meat quality assessment from young goats fed for long periods with castor de-oiled cake. **Meat Science**, v. 106, p. 16-24, 2015.

OLIVER, J. D., GABORIEAUB, M., HILDER, E. F., CASTIGNOLLES, P. Simple and robust determination of monosaccharides in plant fibers in complex mixtures by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1291, p. 179–186, 2013.

OLIW, E. H.; FAHLSTADIUS, P.; HAMBERG, M. Isolation and biosynthesis of 20-hydroxyprostaglandins E1 and E2 in ram seminal fluid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 20, p. 9216-9221, 1986.

PAIVA C.; AMARAL A.; RODRIGUEZ M.; CANYELLAS N.; CORREIG X.; BALLESCÀ J. L.; RAMALHO-SANTOS J.; OLIVA R. 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**, v. 3, n. 3, p. 496-505, 2015.

- PATEL, A. B.; SRIVASTAVA, S.; PHADKE, R. S.; GOVIL, G. Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: an NMR study. **Biophysical Journal**, v. 75, n. 3, p. 1522–1528, 1998.
- PEDRON, P.; TRAXER, O.; HAAB, F.; FARRES, M. T.; TLIGUI, M.; THIBAUT, P.; GATTEGNO, B. Cowper's gland: anatomic, physiological and pathological aspects. **Progres en Urologie** v. 7, n. 4, p. 563–569, 1997.
- PEITZ, B.; OLDS-CLARKE, P. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 3, p. 608-617, 1986.
- PINI, T.; LEAHY, T.; SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; COMBES-SOIA, L.; HARICHAUX, G.; RICKARD, J. P. et al. Proteomic investigation of ram spermatozoa and the proteins conferred by seminal plasma. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 10, p. 3700-3711, 2016.
- PRIMAKOFF, P.; MYLES D. G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. **Science**, v. 298, p. 2183-2185, 2002.
- PRINS, G. S.; LINDGREN, M. **Accessory Sex Glands in the Male**. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set (Vol. 1). Elsevier Inc., 2014.
- PURI, P.; MYERS, K.; KLINE, D.; VIJAYARAGHAVAN, S. Proteomic analysis of bovine sperm YWHA binding partners identify proteins involved in signaling and metabolism. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1183–1191, 2008.
- QIAO, S.; WU, W.; CHEN, M.; TANG, Q.; XIA, Y.; JIA, W.; WANG, X. Seminal plasma metabolomics approach for the diagnosis of unexplained male infertility. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0181115, 2017.
- REGO, J. P.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N. J.; CORBET, D. H.; BURNS, B. M. et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 148, n. 1-2, p. 1–17, 2014.
- REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. A. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 159–166, 2002.
- RICKARD, J. P.; PINI, T.; SOLEILHAVOUP, C.; COGNIE, J.; BATHGATE, R.; LYNCH, G. W.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. et al. Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 148, n. 5, p. 469-478, 2014.
- ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell Tissue Research**, v. 322, n. 1, p. 43-52, 2005.
- RODRÍGUEZ-VILLAMIL, P.; HOYOS-MARULANDA V.; MARTINS, J. A.; OLIVEIRA, A. N.; AGUIAR L. H.; MORENO, F. B.; VELHO, A. L. 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**, v. 85, n. 3, p. 540-554, 2016.
- RUFO, G.; SINGH, J.; BABCOCK, D.; LARDY, H. Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 8, p. 4627-4632, 1982.
- SAFARINEJAD, M. R.; HOSSEINI, S. Y.; DADKHAH, F.; ASGARI, M. A. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 100-105, 2010.
- SCHIRCH, L.; GROSS, T. Serine transhydroxymethylase. Identification as the threonine and allthreonine aldolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 21, p. 5651-5655, 1968.
- SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45, n. 3, p. 633-642, 1996.
- SCOTT, T. W. Lipid metabolism of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 65-76, 1973.
- SELVAIVE-VILLAROEL, A. B.; FERNANDES, A. A. O. Reproductive performance of Morada Nova tropical hair sheep in Ceara State, Brazil. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 2, n. 6, p. 65-70, 2000.
- SETCHELL, B. P., HINKS, N. T., VOGLMAYR, J. K., SCOTT, T. W. Amino acids in ram testicular fluid and semen and their metabolism by spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 105, n. 3, p. 1061-1065, 1967.
- SHIVAJI, S.; SCHEIT, K. H.; BHARGAVA, P. M. **Proteins of seminal plasma**. (1^a ed.). John Wiley & Sons, 1990.
- SHULAEV, V. Metabolomics technology and bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 7, n. 2, p. 128-139, 2006.
- SOSA, M. A.; BARBIERI, M. A.; BERTINI, F. Binding of b-galactosidase from rat epididymal fluid to the sperm surface by high-affinity sites different from phosphomannosyl receptors. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 2, p. 279-285, 1991.
- SOUZA, C. E.; MOURA, A. A.; MONACO E.; KILLIAN, G. J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1-2, p. 72-89, 2008.
- SOUZA, C. E.; REGO, J. P.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T.; NOGUEIRA, F. C.; DOMONT, G. B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F. C et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4436-4456, 2012.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.;

SIEME, H. The role of stallion seminal plasma proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 159–170, 2005.

TOPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P. F.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; DOSTÀLOVÀ, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v. 30, n. 4-5, p. 217–224, 1998.

UCKERT, S.; BAZRAFESHAN, S.; SCHELLER, F.; MAYER, M. E.; JONAS, U.; STIEF, C. G. Functional responses of isolated human seminal vesicle tissue to selective phosphodiesterase inhibitors. **Urology**, v. 70, n. 1, p. 185-189, 2007.

VAN TILBURG, M. F.; RODRIGUES, M. A. M.; MOREIRA, R. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; CÂNDIDO, M. J. D.; MOURA, A. A. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, n. 9, p. 1247–1261, 2013.

VAN TILBURG, M. F.; SOUSA, S. D.; FERREIRA DE MELO, R. B.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; DE ALENCAR MOURA A. Proteome of the rete testis fluid from tropically-adapted Morada Nova rams. **Animal Reproduction Science**, v. 176, p. 20–31, 2017.

VANCE, J. C.; STEENBERGEN, R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. **Progress in Lipid Research**, v. 44, n. 4, p. 207–234, 2005.

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

VIJAYVARGIYA, R.; SCHWARK, W. S.; SINGHAL, R. L. Pyruvate kinase: modulation by L-phenylalanine and L-alanine. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 895-898, 1969.

WEINER, R. I.; GANONG, W. F. Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. **Physiological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 905-976, 1978.

WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. (5th ed). Cambridge University Press, 1992.

WILLIAMS-ASHMAN, H. G.; LOCKWOOD, D. H. Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 171, n. 3, p. 882-894, 1970.

WOOD, P. L.; SCOGGIN, K.; BALL, B. A.; TROEDSSON, M. H.; SQUIRES, E. L. Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- ω -hydroxy-fatty acids. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1212–1221, 2016.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2009.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data

analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 55, p. 14.10.1-14.10.91, 2016.

YING, Y.; CHOW, P. H.; WS. O. Effects of male accessory sex glands on deoxyribonucleic acid synthesis in the first cell cycle of golden hamster embryos. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 659-663, 1998.

APÊNDICE A - LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 – Delineamento experimental	21
Figura 2 – Mapas bidimensionais dos fluidos do trato reprodutivo e membranas espermáticas de carneiros Morada Nova. Os números dos <i>spots</i> referem-se aos mostrados nas tabelas anexadas	27
Figura 3 – Gráficos da ontologia gênica do proteoma dos fluidos do trato reprodutivo de carneiros com base nos processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares	33
Figura 4 – Gráficos da ontologia gênica do proteoma das membranas espermáticas de carneiros com base nos processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares	34
Figura 5 – Contribuição do proteoma principal dos fluidos do trato reprodutivo para a composição do plasma seminal de carneiros	35
Figura 6 – Resumo das proteínas identificadas nas membranas espermáticas de carneiros	36

Capítulo II

Figura 1 – Diagrama de Venn mostrando o número de metabólitos comuns e únicos identificados no fluido das glândulas acessórias de carneiros por LC/MS e GC/MS	48
Figura 2 – Número de metabólitos identificados por classe utilizando-se duas abordagens metabolômicas. Um total de 182 compostos foi detectado por GC/MS (cinza escuro) e 190 por LC/MS (cinza claro). Os metabólitos foram classificados de acordo com as ferramentas de busca Human Metabolome Database (HMDB) e PubChem	48
Figura 3 – Gráfico representativo dos metabólitos mais abundantes detectados no fluido das glândulas acessórias de carneiros	49
Figura 4 – Número de lipídios por categoria identificados por LC/MS. Os lipídios foram classificados de acordo com o LIPID MAPS (LIPID Metabolites and Pathways Strategy)	61

APÊNDICE B - LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 – Proteínas dos fluidos do trato reprodutivo e membranas espermáticas de carneiros identificadas por espectrometria de massas (Esi-Q-Tof). A detecção de uma proteína específica de cada amostra é indicada por uma caixa cinza. Plasma seminal (PS), fluido das glândulas acessórias (FGA), fluido das glândulas vesiculares (FGV), fluido das glândulas bulbouretrais (FGB), fluido da cauda do epidídimo (FCE), membrana dos espermatozoides ejaculados (MEJ), membrana dos espermatozoides da cauda do epidídimo (MEP)	29
---	----

Capítulo II

Tabela 1 – Metabólitos do fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova identificados por GC/MS. Os metabólitos foram classificados de acordo com os bancos de dados HMDB e PubChem. A fórmula química e o número CAS foram incluídos, ambos representam informações importantes para a classificação dos compostos. O ID do HMDB também é especificado	50
Tabela 2 – Metabólitos do fluido das glândulas acessórias de carneiros Morada Nova identificados por LC/MS. Os metabólitos foram classificados de acordo com os banco de dados HMDB e PubChem. Os lipídios foram organizados em categorias de acordo com os LIPID Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS®). LIPID MAPS ID (LM_ID) é detalhado. A fórmula química, o número CAS e o PubChem Compound ID também foram adicionados	55
Tabela 3 – Vias biológicas dos metabólitos do fluido das glândulas acessórias de carneiros. As vias metabólicas foram obtidas pelo MetaboAnalyst 3.0, que utiliza as vias da Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (KEGG)	61

ANEXO A - TABELA 1. PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS. OS SPOTS NUMERADOS SE REFEREM AOS SPOTS MOSTRADOS NA FIGURA 1.

Protein	Experimental¹ kDa/pI	NCBI nr accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Ion score	m/z	Z
Bodhesin-2 Spot 1	12.28/4.33	121484235	80	18	34	1102.5105	2
					80	1102.5153	2
					56	1102.5206	2
					37	1102.5256	2
					56	1103.0255	2
Spot 7	14.52/5.01	121484235	166	27	80	548.2694	2
					39	548.2788	2
					86	1102.5278	2
					27	1103.0205	2
Spot 8	14.0/5.16	121484235	129	35	80	548.2791	2
					23	518.2833	2
Spot 9	14.48/5.12	121484235	195	35	26	1102.5314	2
					80	548.2587	2
					60	548.2803	2
					36	517.7844	2
Spot 12	14.53/5.44	121484235	159	27	36	518.2888	2
					79	1102.5140	2
					80	548.2487	2
					72	548.2803	2
Spot 15	14.40/5.88	121484235	154	27	80	548.7666	2
					79	1102.5281	2
					73	1102.5312	2
Spot 16	14.53/5.30	121484235	195	35	80	548.2618	2
					36	548.2496	2
					80	548.2778	2
					54	548.2808	2
					24	548.2830	2
					36	548.7684	2
					36	517.7810	2
					35	518.2821	2
					36	518.2869	2
					37	1102.5240	2
					59	1102.5245	2
79	1102.5292	2					
Spot 17	12.8/6.0	121484235	117	27	59	1103.0289	2
					80	548.2795	2
Spot 27	16.09/5.08	121484235	147	27	37	1102.5282	2
					80	548.2615	2
Spot 30	16.48/4.8	121484235	195	35	67	1102.5284	2
					33	1103.0220	2
					80	548.2525	2
					80	548.7694	2
					36	517.7907	2
Spot 61	14.54/5.11	121484235	199	35	79	1102.5168	2
					24	1102.5210	2
					24	1103.0305	2
					80	548.2778	2
					86	548.2809	2
					34	517.7863	2

					34	518.2889	2
					79	1102.5239	2
					37	1102.5278	2
					37	1103.0290	2
Binder of sperm 1							
Spot 2	14.73/4.72	219521810	132	45	35	740.6396	3
					20	740.3053	3
					33	740.3252	3
					53	1109.9987	2
					20	740.6294	3
					33	740.6580	3
					49	1236.5785	2
Spot 3	14.74/4.74	219521810	118	45	35	740.6406	3
					18	740.3233	3
					27	740.6550	3
					60	1236.5798	2
Spot 5	14.36/4.91	219521810	328	70	27	616.5108	4
					47	821.6792	3
					39	740.6126	3
					40	740.6336	3
					27	740.6336	3
					53	1110.4619	2
					30	697.5562	4
					28	697.5569	4
					74	697.5573	4
					44	697.5579	4
					55	929.7424	3
					84	929.7453	3
					53	1109.9601	2
					26	740.3154	3
					26	740.3240	3
					24	740.3242	3
					24	740.6498	3
					26	740.6507	3
					26	740.6596	3
					26	1110.4884	2
					29	452.2215	2
					49	1236.4835	2
					22	1236.5630	2
					68	824.7165	3
					22	1237.0288	2
					45	825.0418	3
					49	1237.0659	2
Spot 10	13.85/5.34	219521810	220	63	39	740.6351	4
					32	740.6407	4
					53	1110.4666	2
					68	697.5567	4
					18	740.3085	4
					53	1109.9979	2
					18	740.6317	4
					49	1236.5801	2
Spot 11	14.14/5.36	219521810	221	65	26	821.6821	3
					36	740.6413	3
					77	697.5584	4
					27	740.3288	3
					26	1109.9984	2
					49	824.7130	3
					59	1236.5770	2
					29	1237.0708	2
Bodhesin							

Spot 4	13.85/4.69	77864607	116	17	80	548.2734	2
					53	548.2790	2
					36	548.7648	2
					36	517.7850	2
					22	518.2805	2
Spot 19	15.26/6.19	77864607	81	9	80	548.2504	2
					80	548.2788	2
					42	548.2791	2
					81	548.2795	2
					42	548.2803	2
					36	548.7637	2
					80	548.7673	2
<hr/>							
Spermadhesin Z13-like isoform X2							
Spot 6	13.82/4.99	965785567	135	26	72	894.3825	2
					52	780.6833	3
					26	1170.5481	2
					29	781.0226	3
					63	786.0127	3
					63	786.3290	3
Spot 13	14.37/5.53	965785567	381	47	31	786.3538	3
					46	558.2660	3
					71	836.9297	2
					74	861.1899	4
					35	861.1921	4
					28	861.1945	4
					32	861.1949	4
					28	861.1967	4
					92	1147.9366	3
					62	894.4016	2
					75	894.4565	2
					69	894.4612	2
					39	780.6787	3
					66	780.6946	3
					41	1170.5522	3
					66	781.0156	3
					22	781.0225	3
					37	781.0247	3
					66	786.0138	3
					25	786.0291	3
					54	1178.5453	2
					34	786.3489	3
					39	786.3503	3
25	786.3617	3					
35	561.2903	3					
55	561.6179	3					
72	841.9531	2					
39	561.9602	3					
36	566.9396	3					
66	849.9161	2					
25	849.9290	2					
36	566.9625	3					
44	566.9628	3					
53	566.9633	3					
22	566.9633	3					
39	566.9635	3					
41	566.9640	3					
34	566.9641	3					
63	566.9642	3					
35	566.9646	3					
40	566.9654	3					

						34	566.9655	3
						51	566.9656	3
						49	566.9664	3
						78	849.9479	3
						44	567.2611	3
						44	567.2865	3
						51	567.2909	3
						34	567.2926	3
						35	567.2931	3
						39	567.2944	3
						36	567.2946	3
						22	567.2947	3
						34	567.2956	3
						40	567.2975	3
						49	567.2996	3
Spot 14	13.99/5.87	965785567	164	37		72	894.4555	2
						40	894.4556	2
						47	894.4558	2
						49	780.6955	3
						26	786.0286	3
						36	786.3556	3
						43	566.9647	3
						28	849.9484	2
						23	567.2924	3
<hr/>								
Spermadhesin-1-like								
Spot 18	14.06/6.43	426253212	258	46		49	1004.9812	2
						78	909.4876	2
						72	909.4916	2
						95	630.2916	2
						62	630.7860	2
						24	748.3548	3
						35	748.3557	3
<hr/>								
Superoxide dismutase [Cu-Zn]								
Spot 20	15.82/6.44	223633904	87	10		40	557.6348	3
						46	500.2673	2
<hr/>								
Epididymal secretory protein E1								
Spot 21	16.60/6.65	27806881	280	33		46	758.3536	2
						56	807.0897	3
						36	812.0776	3
						36	812.4194	3
						66	812.4204	3
						41	812.4217	3
						36	812.7519	3
						41	666.8398	2
						84	666.8410	2
						76	666.8411	2
						75	666.8427	2
						63	577.6240	3
						34	577.6262	3
						26	577.6277	3
						42	577.6282	3
						60	577.6290	3
						84	865.9458	3
						42	577.9521	3
						60	577.9532	3
						34	577.9553	3
						26	577.9567	3
<hr/>								
Epididymal-specific lipocalin-5-like isoform X1								
Spot 22	18.79/6.37	803316147	325	39		40	761.1256	4
						46	530.7866	2

					72	531.2840	2
					95	531.3009	2
					46	531.3043	2
					72	531.7964	2
					72	393.7233	2
					95	568.8143	2
					46	569.2926	2
					72	569.2957	2
					95	569.2960	2
					95	604.3169	3
					95	453.4923	4
					46	604.3327	3
					72	843.8984	2
					95	562.9809	2
					95	843.9699	2
					95	843.9700	2
					46	843.9722	2
					72	843.9731	2
					95	843.9736	2
					95	844.4359	2
					95	844.4563	2
					46	844.4689	2
					72	844.4719	2
<hr/>							
Lipocalin							
Spot 23	18.28/6.13	633267628	212	29	38	531.3039	2
					62	568.8159	2
					40	569.2968	2
					48	453.4980	4
					44	604.3327	3
					61	843.9737	2
					63	844.4656	2
<hr/>							
Inactive ribonuclease-like protein 9							
Spot 24	18.40/5.86	803090389	182	23	61	702.8258	2
					65	702.8589	2
					35	702.8604	2
					37	580.9454	3
					46	870.9205	2
					17	870.9219	2
					71	970.7950	3
					48	971.1224	3
<hr/>							
Binder of sperm 5							
Spot 25	18.53/5.35	148225308	191	19	70	764.8270	2
					23	569.7629	2
					30	569.7678	2
					22	570.7710	2
					47	645.7666	2
					44	727.2994	2
Spot 26	18.73/5.36	148225308	186	19	69	764.8266	2
					60	764.8286	2
					24	569.7642	2
					21	569.7664	2
					19	570.2626	2
					28	570.2783	2
					44	645.7590	2
					45	727.2764	2
Spot 28	18.50/5.36	148225308	181	19	71	764.8255	2
					73	764.8291	2
					21	569.7634	2
					24	569.7643	2
					25	570.2808	2

Spot 29	19.12/5.03	148225308	168	19	44	645.7667	2					
					38	727.2993	2					
					54	764.8143	2					
					38	764.8284	2					
					21	569.7636	2					
					23	569.7637	2					
					18	570.2784	2					
					32	645.7638	2					
					28	645.7643	2					
					44	645.7673	2					
					28	646.2609	2					
					47	727.2899	2					
					27	727.2974	2					
					27	727.7933	2					
Spot 31	18.54/4.75	148225308	169	19	39	764.8254	2					
					31	764.8264	2					
					59	764.8286	2					
					31	765.3198	2					
					30	569.7640	2					
					22	569.7658	2					
					44	645.7678	2					
					35	727.2878	2					
					43	764.8275	2					
					31	569.7643	2					
Spot 32	18.66/4.67	148225308	108	19	34	645.7690	2					
					42	476.7130	2					
Spot 33	18.76/4.58	148225308	229	25	49	764.8013	2					
					68	764.8268	2					
					65	764.8276	2					
					55	765.3202	2					
					19	569.7545	2					
					20	569.7609	2					
					19	570.2576	2					
					20	570.2781	2					
					30	570.2781	2					
					19	570.7669	2					
					21	570.7697	2					
					20	570.7786	2					
					26	645.7361	2					
					44	645.7361	2					
					45	727.2803	2					
					53	764.8237	2					
					37	764.8262	2					
					42	764.8497	2					
Spot 34	18.63/4.47	148225308	138	19	23	569.7636	2					
					40	645.7648	2					
					23	727.2992	2					
					62	764.8201	2					
					59	764.8283	2					
					73	764.8289	2					
					21	569.7616	2					
					24	569.7674	2					
					28	570.2784	2					
					19	570.7681	2					
Spot 35	18.72/14.41	148225308	190	19	44	645.7622	2					
					44	727.2801	2					
					61	764.3948	2					
					49	764.8209	2					
					61	764.8392	2					
					61	765.3256	2					
					Spot 37	19.14/4.10	148225308	171	19			

					19	569.7632	2
					18	569.7632	2
					21	569.7637	2
					21	569.7698	2
					28	570.2802	2
					22	570.7711	2
					44	645.7680	2
					38	727.2995	2
Spot 38	17.08/4.18	148225308	135	19	32	764.8265	2
					33	765.3206	2
					18	569.7626	2
					21	569.7646	2
					18	570.2634	2
					18	570.2791	2
					24	645.7663	2
					44	645.7668	2
					37	727.3005	2
Spot 39	21.68/4.14	148225308	193	19	49	764.8228	2
					73	764.8285	2
					38	764.8317	2
					21	569.7646	2
					19	570.2633	2
					29	645.7611	2
					44	645.7678	2
					55	727.2996	2
<hr/>							
Lipocalin-like 1 protein isoform X3							
Spot 36	17.08/4.18	803316219	394	25	65	871.9943	2
					112	1060.4642	2
					43	1060.9558	2
					104	934.4399	2
					46	934.4402	2
					48	934.4409	2
					103	934.4409	2
					86	934.4421	2
					104	934.4426	2
					57	934.4444	2
					60	934.9338	2
					57	934.9384	2
					104	934.9396	2
					48	934.9399	2
					46	934.9408	2
					34	607.7779	2
					53	607.7779	2
					49	607.8154	2
					62	661.3983	2
					31	661.8907	2
<hr/>							
BPI fold-containing family A member 1							
Spot 40	26.43/4.65	672890337	130	15	54	706.4033	2
					40	706.8910	2
					34	795.4758	2
					42	464.2953	2
<hr/>							
Clusterin isoform X1							
Spot 41	36.34/4.43	426220555	292	20	38	551.8243	2
					31	614.9260	3
					80	714.3308	4
					33	659.3181	3
					33	659.6460	3
					34	656.3016	2
					37	763.9008	2
					38	519.2781	2

Spot 42	37.01/4.33	426220555	597	35	38	519.7820	2
					57	551.8170	2
					51	733.8151	4
					84	614.9258	3
					79	706.3336	2
					83	714.3298	2
					83	714.8237	2
					42	659.6424	3
					49	707.3160	2
					50	656.3027	3
					34	1153.5471	2
					52	763.8932	2
					47	519.2728	2
					47	519.7806	2
Spot 45	32.49/4.81	426220555	330	23	46	1014.1755	3
					41	551.8226	2
					34	614.9271	3
					81	714.3306	2
					46	656.3025	3
					45	763.8999	2
					42	519.2782	2
					42	519.7817	2
					42	1014.1777	3
					Spot 47	30.01/5.0	426220555
36	614.9261	3					
62	706.3360	2					
87	714.3289	2					
52	659.3149	3					
49	706.8181	2					
50	656.3005	3					
40	519.2661	2					
40	519.7792	2					
46	1014.1752	3					
35	1014.5052	3					
Spot 48	34.51/5.1	426220555	276	14			
					29	614.9248	3
					62	706.3341	2
					49	714.3221	2
					94	714.3221	2
					81	714.3309	2
					75	714.3331	2
					63	659.3154	3
					40	659.6430	3
					41	519.2630	2
Spot 49	34.52/4.83	426220555	373	18	41	519.7805	2
					53	551.8214	2
					38	615.8716	2
					35	733.8171	4
					54	614.9266	3
					38	921.8925	2
					94	706.3358	2
					68	714.3251	2
					67	714.3309	2
					42	714.8228	2
					49	659.3143	3
					23	659.6432	3
Spot 50	34.50/4.86	426220555	321	14	26	455.2450	2
					30	764.3954	2
					65	551.8222	2
					38	733.8156	4

					70	614.9255	3
					60	921.8929	2
					94	714.3202	2
					79	714.3269	2
					57	659.3137	3
<hr/>							
Protein LEG1 homolog							
Spot 43	39.56/4.37	426235151	384	23	27	442.7649	2
					43	810.4098	2
					46	546.9498	2
					49	541.5872	2
					60	660.2946	2
					39	613.3047	3
					40	498.2517	3
					50	594.8546	2
					32	658.9034	2
Spot 44	42.06/4.37	426235151	240	12	27	442.7653	2
					59	660.2888	2
					34	613.3051	3
					68	498.7419	2
					52	594.8561	2
<hr/>							
Phosphoglycolate phosphatase							
Spot 46	32.10/5.11	803280340	559	32	70	791.9097	2
					68	540.7855	2
					83	666.3152	2
					32	832.4162	2
					91	832.4166	2
					32	832.9103	2
					61	547.2991	2
					48	666.3115	2
					76	759.4204	2
					63	630.8821	2
<hr/>							
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 32 isoform X2							
Spot 51	36.84/4.73	426256426	240	7	72	957.9275	2
					60	958.4159	2
					49	569.7539	2
					28	515.2354	2
					62	811.9402	2
					29	478.2500	3
<hr/>							
Actin, beta							
Spot 52	39.66/5.47	148744172	269	20	27	652.0250	3
					31	507.7457	2
					46	566.7669	2
					47	895.9554	2
					29	895.9567	2
					47	896.4404	2
					44	589.3123	2
					76	506.2393	2
<hr/>							
Carboxypeptidase Q isoform X1							
Spot 53	49.64/5.37	803106165	558	22	41	658.8577	2
					33	547.3147	2
					38	547.3190	2
					38	547.8099	2
					74	577.3492	2
					42	602.3261	3
					72	703.8718	2
					66	617.2715	2
					67	450.2751	2
					28	928.4236	2
					36	619.6074	2
					44	928.9154	2

					34	951.4337	2
					113	951.4497	2
					29	951.9399	2
<hr/>							
72 kDa type IV collagenase							
Spot 54	65.99/5.19	27807447	317	9	33	555.2905	2
					69	709.8797	2
					30	710.3715	2
					64	804.8372	2
					56	651.7616	2
					52	695.8765	2
					22	696.3649	2
					44	519.2579	2
Spot 55	66.0/5.57	27807447	233	8	61	709.8793	2
					46	804.8378	2
					69	695.8729	2
					33	519.2587	2
					27	457.7348	2
<hr/>							
Serum albumin							
Spot 56	64.01/5.7	57164373	752	21	65	798.3958	2
					54	480.6089	3
					50	642.3619	2
					25	744.8070	2
					94	752.8880	2
					41	542.6447	3
					72	749.4210	2
					29	749.9130	2
					101	870.9246	2
					56	871.4166	2
					64	569.2383	2
					28	853.0847	3
					49	571.8636	2
					37	508.3065	2
					30	708.3501	2
					79	708.3501	2
					25	708.8434	2
Spot 57	63.63/5.77	57164373	812	25	25	473.9017	3
					28	710.3546	2
					35	630.3147	3
					69	798.3955	2
					54	480.6093	3
					47	642.3630	2
					34	653.3639	2
					117	752.3956	2
					65	542.6443	3
					52	813.9631	2
					33	749.9136	2
					82	870.9246	2
					34	871.4171	2
					70	569.2393	2
					47	853.0837	2
					31	571.8644	2
					26	507.8143	2
					79	708.3514	2
					41	708.8438	2
Spot 58	63.52/5.85	57164373	918	27	31	473.9020	3
					38	583.8925	3
					25	584.2199	3
					45	798.3964	2
					51	480.6086	3
					44	642.3616	2

					39	744.8071	2
					44	653.3630	2
					111	752.3929	2
					63	542.6472	3
					120	813.4708	2
					74	813.9615	2
					50	749.9140	2
					96	870.9247	2
					69	569.2392	2
					76	569.2405	2
					65	853.0842	3
					23	507.8146	2
					35	508.3072	2
					79	708.3507	2
					38	708.8427	2
<hr/>							
Heat shock 70 kDa protein 1-like							
Spot 59	61.10/6.09	426250526	491	19	64	744.3578	2
					40	586.9701	3
					64	815.9116	2
					53	599.3532	2
					78	599.3541	2
					53	599.8485	2
					57	830.4586	2
					58	830.9487	2
					37	559.2490	2
					46	838.3740	2
					39	617.8298	2
					22	633.8666	2
					46	563.2898	2
					36	774.0562	3
<hr/>							
Inhibitor of carbonic anhydrase-like isoform X2							
Spot 60	69.93/6.52	426218286	602	25	34	460.9142	3
					34	649.2963	3
					23	755.8688	2
					33	548.7884	2
					36	504.2477	3
					88	726.4003	2
					92	909.9196	2
					64	639.3104	2
					25	669.3410	3
					74	593.8153	4
					73	699.8489	2
					30	794.3500	2
<hr/>							
Prostaglandin-H2 D-isomerase							
Spot 62	23.39/5.73	57164293	175	14	99	740.8629	2
					108	740.8637	2
					33	768.9219	2
					67	768.9219	2

¹Valores experimentais foram deduzidos do respectivo mapa 2D pelo software PDQuest.

²Os números sobrescritos entre parênteses referem-se à posição de cada peptídeo dentro da sequência de aminoácidos da proteína completa, de acordo com a busca no banco de dados Mascot.

ANEXO B - TABELA 2. PROTEÍNAS DO FLUIDO DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS. OS SPOTS NUMERADOS SE REFEREM AOS SPOTS MOSTRADOS NA FIGURA 1.

Protein	Experimental ¹ kDa/pI	NCBI nr accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Ion score	m/z	Z
Bodhesin-2							
Spot 1	11.50/4.40	121484235	78	18	78	1102.5239	2
					57	1103.0220	2
Spot 3	16.69/4.33	121484235	139	27	80	548.2822	2
					59	1102.5303	2
Spot 4	16.50/4.47	121484235	157	27	80	548.2791	2
					77	1102.5277	2
Spot 7	16.19/4.82	121484235	203	35	80	547.7808	2
					80	548.2566	2
					35	548.2566	2
					80	548.2808	2
					86	548.2810	2
					40	548.2820	2
					71	548.2827	2
					72	548.2835	2
					80	548.2836	2
					80	548.7713	2
					35	548.7713	2
					38	517.7801	2
					33	518.2820	2
					38	518.2890	2
					64	1102.4989	2
					80	1102.5259	2
					66	1103.0183	2
Spot 14	15.71/5.52	121484235	195	35	80	706.3118	2
					49	706.3433	2
					36	827.9203	2
					79	1654.9567	1
					67	1654.9467	1
					80	827.9892	2
					80	827.9944	2
					80	828.4808	2
					80	828.4825	2
					36	706.3118	2
					34	706.3433	2
					78	827.9203	2
					63	1654.9567	1
					43	1654.9467	1
					25	827.9892	2
					63	827.9944	2
					43	828.4808	2
					25	828.4825	2
					36	827.9203	2
Spot 16	15.66/5.92	121484235	162	27	80	548.2700	2
					82	1102.5305	2
					79	1102.5314	2
					49	1103.0225	2

Spot 56	20.10/4.90	121484235	190	35	51	548.2760	2					
					80	548.6407	2					
					80	548.7706	2					
					51	548.7813	2					
					31	518.2845	2					
					79	1102.5306	2					
					67	1103.0250	2					
Spot 57	20.02/5.16	121484235	192	35	80	548.2579	2					
					80	548.2774	2					
					65	548.2824	2					
					80	548.7732	2					
					34	517.2780	2					
					79	1102.5308	2					
					79	1102.5334	2					
					44	1103.0254	2					
Beta-microseminoprotein isoform X2												
Spot 2	16.69/4.33	426255960	96	18	63	563.3067	2					
					33	622.7928	2					
Bind of sperm 1												
Spot 5	16.34/4.61	219521810	140	45	43	740.6439	3					
					22	740.3145	3					
					42	1109.9994	2					
					22	740.6385	3					
					16	740.6579	3					
					16	740.6579	3					
					60	824.7175	3					
					49	1236.5830	2					
					Spot 6	16.19/4.83	219521810	279	65	30	616.5135	4
										36	821.6853	3
35	740.6432	3										
37	740.6445	3										
53	1110.4703	2										
83	697.5582	4										
96	929.7499	3										
23	740.3021	3										
42	1109.9937	2										
26	1110.4928	2										
58	824.7173	3										
20	1236.5725	2										
49	1236.5793	2										
22	1237.0660	2										
49	1237.0692	2										
Spot 8	15.70/5.0	219521810	245	65	23	1237.0692	2					
					33	616.5145	4					
					33	821.6885	3					
					39	740.6267	3					
					49	1110.4713	2					
					62	697.5602	4					
					19	740.3060	3					
					42	1110.0035	2					
					19	740.6312	3					
					65	824.7172	3					
					56	1236.5830	2					
					Spot 13	14.40/5.40	219521810	92	28	35	740.6290	3
										43	1110.4700	2
20	740.3155	3										
53	1110.0004	2										
20	740.6388	3										
16	740.6570	3										
16	740.6570	3										

						25	740.6593	3
Spermadhesin Z13-like isoform X1								
Spot 9	14.35/5.06	803193866	78	20	52	894.4595	2	
					27	786.0306	3	
Spot 10	15.81/5.15	803193866	202	28	56	894.4571	2	
					69	894.4583	2	
					43	780.6996	3	
					27	781.0277	3	
					63	786.0205	3	
					37	786.3577	3	
					41	786.3597	3	
					33	561.9632	3	
					42	566.9342	3	
					61	566.9506	3	
					37	566.9654	3	
					32	566.9657	3	
					37	849.9510	2	
					69	849.9520	2	
					52	567.2917	3	
					34	567.2926	3	
					32	567.2935	3	
					37	567.2966	3	
Spot 11	15.90/5.15	803193866	192	28	70	894.4602	2	
					61	786.0212	3	
					61	786.3434	3	
					30	786.3596	3	
					42	566.9657	3	
					61	566.9663	3	
					37	567.2944	3	
					61	567.2962	3	
Spot 12	16.20/5.17	803193866	70	17	23	849.4553	2	
					47	566.9625	3	
					36	567.2938	3	
Spot 15	15.48/5.62	803193866	264	36	42	558.2977	3	
					39	836.9484	2	
					87	894.4426	2	
					60	894.4595	2	
					55	780.6897	3	
					55	781.0051	3	
					36	781.0294	3	
					67	786.0291	3	
					44	1178.5498	2	
					33	786.3428	3	
					36	786.3506	3	
					31	561.6313	3	
					50	561.6355	3	
					31	561.9620	3	
					44	566.9360	3	
					42	566.9644	3	
					34	566.9652	3	
					37	566.9660	3	
					64	849.9457	2	
					67	849.9478	2	
					46	566.9682	3	
					45	566.9682	3	
					65	849.9517	2	
					34	567.2956	3	
					37	567.2963	3	
					21	850.4431	2	
					42	567.2997	3	

Spot 17	14.80/5.94	803193866	165	28	46	567.3016	3
					72	894.4608	2
					32	786.3562	3
					61	566.9651	3
					39	566.9664	3
					22	567.2948	3
					42	567.2948	3
					61	567.2957	3
					46	567.2965	3
Inactive ribonuclease-like protein 9							
Spot 18	23.91/6.37	803090389	203	23	36	694.8643	2
					102	702.8610	2
					61	702.8610	2
					82	702.8630	2
					39	580.9477	3
					45	870.9239	2
					19	871.4144	2
					56	970.7973	3
					44	971.1245	3
Spot 19	23.06/6.04	803090389	269	27	101	702.8145	2
					47	702.8145	2
					82	702.8592	2
					13	830.0522	3
					24	581.2743	3
					63	760.3687	4
					48	1013.4925	3
					37	965.4603	3
					37	965.7905	3
Spot 20	27.01/6.23	803090389	208	23	42	971.1223	3
					41	694.8633	2
					87	702.8417	2
					49	702.8601	2
					61	702.8613	2
					82	702.8624	2
					30	870.9224	2
					39	581.2758	3
					32	581.2762	3
Spot 21	23.70/5.86	803090389	260	27	32	971.1240	3
					71	694.8604	2
					82	702.8603	2
					84	702.8607	2
					81	702.8607	2
					28	830.0587	3
					36	580.9475	3
					39	870.9227	2
					22	871.4149	2
Spot 22	23.88/5.66	803090389	136	16	40	965.4635	3
					78	970.7944	3
					77	694.8604	2
					82	702.8608	2
					81	702.8615	2
					61	702.8616	2
					55	970.7966	3
					42	971.1244	3
Binder of sperm 5							
Spot 23	23.10/5.43	148225308	169	19	61	764.8163	2

					58	764.8284	2
					48	764.8292	2
					43	765.3090	2
					19	569.7648	2
					21	569.7650	2
					20	569.7656	2
					32	570.2802	2
					15	570.2810	2
					22	570.7627	2
					40	645.7689	2
					37	727.2929	2
					17	727.3016	2
Spot 24	24.0/5.43	148225308	183	19	58	764.8302	2
					40	765.2994	2
					20	569.7650	2
					19	569.7650	2
					21	569.7655	2
					20	569.7665	2
					26	570.2822	2
					28	645.7686	2
					55	645.7689	2
Spot 25	24.29/5.09	148225308	183	19	44	727.2966	2
					52	764.7590	2
					78	764.8284	2
					59	764.8284	2
					57	764.8300	2
					52	765.2654	2
					40	765.3191	2
					21	569.7648	2
					19	569.7651	2
					21	569.7652	2
					21	570.2667	2
					26	570.2795	2
					20	570.7730	2
					55	645.7701	2
Spot 26	23.70/4.83	148225308	178	19	24	727.2974	2
					49	764.7692	2
					85	764.8292	2
					62	764.8297	2
					64	764.8313	2
					48	764.8327	2
					15	764.8356	2
					41	765.3038	2
					37	765.3038	2
					51	765.3223	2
					48	765.3244	2
					20	569.7651	2
					26	569.7664	2
					21	569.7681	2
					21	570.2694	2
					24	570.2819	2
					45	645.7698	2
Spot 27	23.50/4.65	148225308	143	19	22	727.3029	2
					58	764.8249	2
					57	765.3210	2
					20	569.7628	2
					19	570.2790	2
					22	570.7699	2
					26	645.7666	2
					37	727.2961	2

Spot 28	23.42/4.49	148225308	144	19	62	764.8180	2					
					50	764.8264	2					
					39	765.2813	2					
					22	569.7623	2					
					20	569.7625	2					
					21	569.7626	2					
					30	570.2790	2					
					19	570.7650	2					
					29	645.7651	2					
					22	727.2988	2					
					Spot 29	24.72/4.24	148225308	163	19	61	764.8257	2
										47	764.8272	2
47	765.3181	2										
57	765.3203	2										
20	569.7623	2										
26	570.2788	2										
28	645.7645	2										
47	727.2908	2										
Spot 30	27.10/4.24	148225308	120	19						56	764.7977	2
										56	765.3183	2
										19	569.7627	2
										24	569.7637	2
					39	645.7636	2					
Spot 31	24.84/4.39	148225308	173	19	61	764.8098	2					
					50	764.8273	2					
					50	765.3185	2					
					20	569.7635	2					
					20	569.7642	2					
					31	570.2746	2					
					52	645.7604	2					
					29	727.2867	2					
Spot 32	24.83/4.40	148225308	163	19	78	764.8279	2					
					54	764.8282	2					
					48	764.8296	2					
					20	569.7637	2					
					23	569.7647	2					
					25	569.7656	2					
					21	569.7656	2					
					26	570.7702	2					
					27	570.2805	2					
					28	570.7747	2					
					35	645.7663	2					
					22	645.7694	2					
					22	727.3008	2					
					Spot 33	25.03/4.15	148225308	187	19	57	764.7907	2
60	764.7907	2										
40	764.8261	2										
40	765.3208	2										
21	569.7653	2										
20	569.7659	2										
25	570.2816	2										
49	645.7695	2										
54	727.3000	2										
Spot 34	25.0/4.19	148225308	169	19						63	764.8207	2
					73	764.8295	2					
					54	764.8295	2					
					81	764.8302	2					
					40	765.3175	2					
					20	569.7652	2					
					25	569.7655	2					

					20	569.7658	2
					42	645.7687	2
					21	727.3027	2
Spot 35	23.42/4.24	148225308	175	19	56	764.8051	2
					50	764.8051	2
					75	764.8291	2
					46	764.8299	2
					54	765.3220	2
					46	765.3232	2
					20	569.7653	2
					20	569.7654	2
					20	569.7656	2
					19	569.7658	2
					42	645.7666	2
					37	727.3029	2
Spot 36	24.14/4.08	148225308	180	19	58	764.8191	2
					67	764.8287	2
					77	764.8298	2
					39	765.3214	2
					52	765.3216	2
					20	569.7648	2
					18	569.7648	2
					21	569.7654	2
					28	569.7658	2
					17	570.2813	2
					42	645.7694	2
					34	727.3012	2
					18	727.3025	2
BPI fold-containing family A member 1							
Spot 37	29.0/4.60	672890337	369	32	62	706.4011	2
					36	706.8972	2
					33	706.8972	2
					43	827.9735	2
					44	827.9827	2
					46	696.3829	3
					99	696.3846	3
					114	696.7126	3
					90	1044.5714	2
					46	795.4497	2
					51	464.2900	2
					44	464.3004	2
					52	614.3533	2
					41	614.8452	2
					47	614.8452	2
Spot 38	30.0/4.60	672890337	363	32	76	706.3659	2
					30	706.8964	2
					26	827.9556	2
					109	696.3643	3
					32	696.3798	3
					85	1044.0786	2
					96	696.6895	3
					39	696.7093	3
					32	696.7155	3
					47	795.4604	2
					24	464.2721	2
					51	464.2721	2
					24	464.3000	2
					24	464.7813	2
					55	614.3536	2
					42	614.8449	2

Spot 39	28.76/4.72	672890337	254	23	49	614.8454	2
					63	706.3836	2
					22	706.3942	2
					52	706.8944	2
					33	827.9905	2
					115	696.3815	3
					105	1044.0737	2
Spot 40	28.72/4.79	672890337	307	32	43	464.2890	2
					73	706.3998	2
					53	706.4040	2
					59	706.4044	2
					53	706.8971	2
					35	827.9940	2
					60	696.3811	3
					83	696.7117	3
					36	795.4784	2
					43	464.2880	2
					27	464.3008	2
					18	464.7900	2
					36	614.8445	2
<hr/>							
Clusterin							
Spot 41	33.14/5.33	426220555	114	10	41	656.2815	3
					26	983.9559	2
					38	1154.5533	2
					35	519.7784	2
Spot 42	36.38/5.34	426220555	226	14	50	615.8675	2
					45	551.8222	2
					42	733.8143	4
					45	733.8143	4
					52	978.0862	3
					42	734.0649	4
					43	714.3279	2
					49	714.3305	2
					33	659.3139	3
					33	659.6436	3
Spot 43	29.90/5.26	426220555	68	5	27	656.6309	3
					42	519.2818	2
Spot 44	36.34/5.22	426220555	228	14	51	551.8250	2
					34	733.8161	4
					47	734.0632	4
					44	714.3306	2
					79	714.3318	2
					44	714.8239	2
					52	659.6451	3
Spot 45	33.74/4.96	426220555	173	17	28	734.0640	4
					34	659.3199	3
					50	656.3008	3
					25	763.9035	2
					37	519.2843	2
Spot 46	35.96/5.03	426220555	336	17	63	551.8251	2
					37	733.8171	4
					39	734.0631	4
					39	614.9282	3
					86	714.3333	2
					51	714.3333	2
					66	714.8251	2
					48	714.8272	2
					86	714.8315	2
					50	659.3168	3
					30	659.6447	3

					24	455.2468	2
					37	519.2856	2
72kDa type IV collagenase							
Spot 47	82.77/5.32	261244994	132	3	72	709.8774	2
					61	695.8724	2
					33	695.8724	2
Cartilage acidic protein 1 isoform 1							
Spot 48	82.47/5.25	328927038	209	6	45	439.2516	2
					30	509.9192	3
					133	961.4787	2
					44	714.3306	2
					79	714.3318	2
					44	714.8239	2
					52	659.6451	3
Cartilage acidic protein 1 isoform X4							
Spot 49	83.43/5.19	803192704	349	12	41	514.7966	2
					36	860.3930	2
					52	439.2522	2
					56	509.5912	2
					51	760.3565	3
					13	961.4776	2
Serum albumin							
Spot 50	78.37/5.77	57164373	189	8	36	798.3940	2
					28	653.3633	2
					43	542.6448	3
					53	813.4689	2
					74	708.3506	2
Spot 51	68.67/5.79	57164373	125	4	37	542.9738	3
					21	749.4215	2
					68	708.3522	2
Spot 52	68.67/5.83	57164373	288	12	54	798.3960	2
					41	480.6095	3
					55	542.6469	3
					67	813.4697	2
					54	853.0836	3
					74	708.3514	2
Inhibitor of carbonic anhydrase-like isoform X2							
Spot 53	88.58/6.29	426218286	224	9	36	755.8554	2
					46	909.9182	2
					56	639.3137	2
					53	699.8498	2
					34	794.3503	2
Spot 55	87.67/6.47	426218286	279	10	66	755.8685	2
					43	504.2512	3
					56	909.9233	2
					56	639.3154	2
					62	699.8525	2
Inhibitor of carbonic anhydrase-like isoform X1							
Spot 54	87.31/6.38	548451661	323	10	50	648.3061	2
					35	548.7642	2
					34	504.2516	3
					96	909.2226	2
					57	909.9236	2
					62	699.8516	2
					47	794.3555	2
Zymogen granule protein 16 homolog B-like							
Spot 58	19.82/5.42	803280477	242	45	41	589.7953	2
					28	590.2881	2
					23	528.8314	2

					23	529.3397	2
					50	974.4996	3
					61	614.3110	2
					43	614.3259	2
					43	614.8190	2
					55	857.8618	2
					68	857.8633	2
					55	858.3525	2
<hr/>							
Lipocalin-15-like isoform X2							
Spot 59	20.16/4.20	803316219	360	22	35	750.0609	3
					50	871.9976	2
					52	871.9984	2
					77	871.9988	2
					85	872.0009	2
					50	872.4874	2
					52	872.4961	2
					78	1060.4672	2
					31	1060.9586	2
					42	1060.9586	2
					39	926.4228	2
					30	934.4379	2
					69	934.4412	2
					95	934.4415	2
					104	934.4421	2
					69	934.9321	2
					45	934.9354	2
					30	934.9389	2
					95	934.9420	2
					60	661.4003	2

¹Valores experimentais foram deduzidos do respectivo mapa 2D pelo software PDQuest.

²Os números sobrescritos entre parênteses referem-se à posição de cada peptídeo dentro da sequência de aminoácidos da proteína completa, de acordo com a busca no banco de dados Mascot.

**ANEXO C - TABELA 3. PROTEÍNAS DO FLUIDO DAS GLÂNDULAS
VESICULARES DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR
ESPECTROMETRIA DE MASSAS. OS SPOTS NUMERADOS SE REFEREM AOS
SPOTS MOSTRADOS NA FIGURA 1.**

Protein	Experimental ¹ kDa/pI	NCBIprot or SwissProt	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Ion score	m/z	z
Bodhesin							
Spot 1	12.12/4.44	ABB05175.1	86	18	86	1102.5261	2
Spot 2	16.06/4.52	ABB05175.1	80	9	80	548.2782	2
Spot 3	15.99/4.66	ABB05175.1	80	9	80	548.2767	2
Spot 5	15.88/4.82	ABB05175.1	80	9	80	548.2769	2
Spot 7	15.86/4.00	ABB05175.1	80	9	80	548.2775	2
Spot 8	15.38/5.11	ABB05175.1	86	9	86	548.2790	2
Spot 9	15.63/5.16	ABB05175.1	80	9	80	548.2764	2
Spot 11	15.55/5.47	ABB05175.1	160	27	80	548.2586	2
					81	548.2788	2
					79	1102.5214	2
					70	1103.0164	2
Spot 12	15.33/5.56	ABB05175.1	86	9	86	548.2784	2
Spot 13	15.30/5.86	ABB05175.1	154	27	80	548.2773	2
					74	1102.5261	2
Spot 14	16.57/6.18	ABB05175.1	80	9	80	548.2772	2
Spot 24	18.80/4.89	ABB05175.1	80	9	80	548.2789	2
Bodhesin-2							
Spot 3	15.99/4.66	ABM54472.1	175	27	80	548.2756	2
					95	1102.5242	2
Spot 4	15.98/4.65	ABM54472.1	175	27	80	548.2756	2
					95	1102.5242	2
Spot 6	15.43/4.92	ABM54472.1	165	27	80	548.2553	2
					86	548.2780	2
					85	548.2783	2
					80	548.7678	2
					79	1102.5236	2
					78	1103.0146	2
Binder of sperm 1							
Spot 7	15.86/4.00	NP_001137137.1	96	17	80	697.5503	4
					96	929.7345	3
					67	930.0688	3
Thioredoxin							
Spot 10	14.40/5.20	DAA26501.1	85	12	85	714.3452	2
Spermadhesin Z13-like isoform X2							
Spot 12	15.33/5.56	XP_014962323.1	71	10	71	836.9448	2
Inactive ribonuclease like protein 9							
Spot 15	22.92/6.30	XP_012036469.1	156	16	74	702.8572	2
					82	702.8573	2
					74	970.7881	3
Spot 16	24.25/6.02	XP_012036469.1	160	16	82	702.8560	2
					82	702.8576	2
					78	970.7892	3
Spot 17	23.24/6.01	XP_012036469.1	87	5	77	702.8562	2
					87	702.8568	2
Spot 18	21.91/5.97	XP_012036469.1	84	5	84	702.8581	2
Spot 19	23.46/5.78	XP_012036469.1	82	5	82	702.8553	2
					82	702.8566	2

Spot 20	23.58/5.60	XP_012036469.1	150	16	82	702.8557	2
					74	702.8571	2
					68	970.7898	2
Spot 21	23.44/5.59	XP_012036469.1	72	5	70	702.8567	2
					72	702.8568	2
Spot 22	22.02/5.36	XP_012036469.1	78	5	78	702.8571	2
Spot 23	23.56/5.39	XP_012036469.1	73	5	73	702.8588	2
Binder of sperm 5							
Spot 23	23.56/5.39	NP_001087251.1	73	7	73	764.8240	2
Spot 25	23.29/4.86	NP_001087251.1	73	7	73	764.8256	2
Spot 26	23.19/4.68	NP_001087251.1	86	7	71	764.8239	2
Spot 27	23.05/4.53	NP_001087251.1	81	7	79	764.8238	2
					81	764.8240	2
Spot 28	26.39/4.22	NP_001087251.1	71	7	71	764.8225	2
Spot 29	23.94/4.10	NP_001087251.1	103	13	103	1243.0511	2
14-3-3 protein							
Spot 30	31.51/4.65	AAC37321.1	297	17	105	732.3585	2
					73	732.3586	2
					72	628.7995	2
					85	612.6459	3
					120	918.4724	2
Clusterin isoform X1							
Spot 31	36.39/4.89	XP_004004480.1	80	2	80	714.3275	2
					79	764.8798	2
Spot 32	37.46/5.08	XP_004004480.1	74	2	74	714.3285	2
Annexin A4 isoform X1							
Spot 33	34.45/5.56	XP_004005861.1	717	33	110	769.3667	2
					123	860.4513	2
					95	860.4535	2
					94	831.4122	2
					73	692.3563	2
					72	705.3330	2
					84	833.9279	2
					86	588.2999	2
					79	546.2758	2
Aldose reductase							
Spot 34	39.17/5.73	XP_004008126.1	166	7	80	566.3164	2
					87	778.4169	2
					87	778.9163	2
Spot 35	38.77/6.00	XP_004008126.1	76	3	76	566.3154	2
Spot 36	37.58/6.33	XP_004008126.1	76	3	76	566.3135	2
Spot 37	36.58/6.43	XP_004008126.1	74	3	74	566.3161	2
Creatine kinase B-type isoform X2							
Spot 38	44.78/5.65	XP_012020982.1	333	12	85	652.3676	2
					96	793.9244	2
					77	793.9265	2
					75	793.9268	2
					78	707.6794	3
					76	982.9717	2
Spot 39	46.63/5.50	XP_012020982.1	228	14	83	793.9244	2
					71	793.9271	2
					76	793.9273	2
					71	982.9731	2
					77	932.9930	2
Actin, cytoplasmic 1							
Spot 40	43.66/5.40	ACTB_SHEEP	272	13	70	895.9504	2
					70	895.9511	2
					70	896.4469	2
					125	1116.0464	2
					79	758.8540	2

Spot 41	43.65/5.36	ACTB_SHEEP	202	9	72	759.3479	2
					125	1116.0440	2
					73	506.2388	3
Spot 42	43.91/5.23	ACTB_SHEEP	87	3	77	759.3483	2
					89	758.8563	2
					84	759.3495	2
Spot 43	43.85/5.19	ACTB_SHEEP	191	9	107	1116.0447	2
					85	758.8566	2
Protein disulfide-isomerase isoform X1							
Spot 44	59.09/4.85	XP_004013116.2	93	2	93	890.9252	2
Calreticulin							
Spot 45	56.45/4.34	XP_004008533.1	79	2	79	726.8251	2
Serum albumin							
Spot 46	71.38/4.13	NP_001009376.1	389	8	101	752.3911	2
					101	813.4671	2
					101	870.9208	2
Spot 49	69.78/5.71	NP_001009376.1	476	11	87	708.3496	2
					74	798.3930	2
					109	752.3904	2
					93	813.4652	2
					110	870.9185	2
					93	700.3506	2
Spot 50	69.28/5.85	NP_001009376.1	502	8	78	708.3485	2
					109	752.3905	2
					120	813.4678	2
					85	749.4178	2
					91	870.9087	2
					69	871.4077	2
					99	700.3496	2
					92	708.3488	2
78 kDa glucose-regulated protein							
Spot 47	73.31/5.06	XP_004005686.1	315	8	77	783.8959	2
					75	776.9011	2
					85	764.8777	2
					78	730.8859	2
Spot 48	73.15/5.13	XP_004005686.1	293	6	71	783.8966	2
					79	764.8798	2
					72	665.3124	2
					72	730.8848	2
Inhibitor of carbonic anhydrase-like isoform X2							
Spot 51	75.69/6.33	XP_004003380.1	169	3	90	726.4009	2
					78	699.8477	2
Peroxiredoxin-2							
Spot 52	25.84/4.95	NP_001159672.1	71	8	71	867.9961	2
Metalloproteinase inhibitor 2							
Spot 53	26.83/6.49	NP_001159658.1	80	6	80	760.8676	2

¹Valores experimentais foram deduzidos do respectivo mapa 2D pelo software PDQuest.

²Os números sobrescritos entre parênteses referem-se à posição de cada peptídeo dentro da sequência de aminoácidos da proteína completa, de acordo com a busca no banco de dados Mascot.

**ANEXO D - TABELA 4. PROTEÍNAS DO FLUIDO DAS GLÂNDULAS
BULBOURETRAIAS DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR
ESPECTROMETRIA DE MASSAS. OS SPOTS NUMERADOS SE REFEREM AOS
SPOTS MOSTRADOS NA FIGURA 1.**

Protein	Experimental ¹ kDa/pI	NCBI nr accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Ion score	m/z	z
Beta-microseminoprotein							
Spot 1	15.12/4.28	426255960	92	18	47	563.3036	2
					47	563.7927	2
					45	622.2688	2
					31	622.7902	2
Spot 3	15.31/4.37	426255960	126	24	58	563.3042	2
					58	563.8001	2
					24	434.2036	2
					44	622.7045	2
					33	622.7921	2
Mammaglobin-A							
Spot 2	13.93/4.40	426251874	177	43	59	460.5643	3
					28	690.3466	2
					73	918.4397	2
					41	918.9324	2
					46	855.8843	2
Thioredoxin domain-containing protein 17							
Spot 4	15.38/4.83	251823921	77	15	44	560.7897	2
					32	478.3136	2
Galectin 1							
Spot 5	14.40/4.90	57164313	70	17	25	484.7396	2
					45	854.9521	2
Thioredoxin							
Spot 6	14.15/5.23	57164261	206	42	38	714.3065	2
					60	714.3477	2
					27	714.3978	2
					33	714.8386	2
					60	714.8406	2
					57	493.9150	3
					67	740.3914	2
					44	602.7642	2
					41	610.7626	2
					35	636.8582	2
BPI fold-containing family A member 1							
Spot 7	12.52/5.59	426241323	92	13	39	563.3042	2
					53	563.8001	3
Spot 17	30.70/5.27	426241323	145	22	47	827.9890	2
					21	696.3818	3
					37	795.4738	2
					41	464.2982	2
Spot 18	24.42/5.26	426241323	89	13	39	706.4017	2
					50	696.7079	3
Spot 19	26.08/4.95	426241323	295	32	63	706.4014	2
					26	827.9908	2
					84	696.3766	3
					84	696.7046	3
					45	795.4703	2
					22	464.2981	2

Spot 20	28.94/5.15	426241323	375	32	32	614.3497	2
					56	614.8423	2
					85	706.3227	2
					45	706.3798	2
					45	827.9136	2
					53	552.3257	3
					86	1044.0581	2
					70	1044.5515	2
					46	787.4767	2
					47	795.3956	2
Spot 21	28.27/4.96	426241323	484	41	41	464.7779	2
					63	614.3414	2
					50	614.8270	2
					91	706.3199	2
					49	706.3789	2
					49	706.8725	2
					46	827.9002	1
					45	1654.9152	1
					26	1654.9152	3
					53	552.3255	2
Spot 22	30/4.65	426241323	609	48	29	827.9876	2
					21	828.4787	2
					123	1044.0145	2
					24	696.7088	3
					50	787.4771	2
					43	795.3784	2
					25	1589.9182	1
					20	530.6491	3
					35	795.4731	2
					42	795.4738	2
35	795.9632	2					
25	464.7730	2					
22	614.3438	2					
62	614.3512	2					
39	614.8046	2					
47	614.8215	2					
38	810.8102	3					
42	843.8316	3					
44	706.3126	2					
85	706.3259	2					
40	706.3895	2					
40	706.8784	2					
25	1654.9199	1					
45	1654.9199	1					
57	827.9986	2					
123	1044.0319	2					
79	1044.5253	2					
56	787.4775	2					
48	795.3871	2					
32	1589.8986	1					
20	1589.8986	1					
26	795.4740	2					
57	463.7658	2					
21	605.6673	3					
62	614.3289	2					
44	614.8226	2					
46	810.8080	3					
18	1215.7217	2					
27	811.1373	3					
102	843.8326	3					

Spot 23	32.38/4.57	426241323	482	47	75	706.3118	2
					47	706.3433	2
					52	827.9203	2
					42	1654.9567	1
					23	1654.9467	1
					42	827.9892	2
					43	827.9944	2
					32	828.4808	2
					31	828.4825	2
					104	1044.0349	2
					68	1044.5304	2
					56	787.4783	2
					13	795.3817	2
					44	795.4533	2
					28	795.4716	2
					13	1589.9388	2
					44	795.9498	2
					28	795.9555	2
					21	464.7757	2
					59	829.9599	2
44	614.3500	2					
42	614.8140	2					
23	810.8119	3					
48	843.8320	3					
Spot 24	31.98/4.67	426241323	367	29	69	706.3520	2
					72	827.9493	2
					35	827.9493	2
					58	827.9888	2
					56	827.9900	2
					115	696.3656	3
					129	1044.0725	2
					41	696.7068	3
					89	696.7087	3
					38	787.4768	2
					45	795.4558	2
					19	795.4738	2
					50	614.3514	2
					52	614.8358	2
44	614.8431	2					
Spot 30	39.34/4.95	426241323	206	24	61	706.4025	2
					55	827.9887	2
					32	464.2964	2
					58	843.8316	3
<hr/>							
Transthyretin							
Spot 8	14.92/6.01	57526651	331	55	71	704.8153	2
					76	530.5804	3
					107	795.3709	2
					31	809.3950	3
					44	837.0845	3
					79	824.1017	3
<hr/>							
Protein S100-A11							
Spot 9	12.98/6.62	426216616	90	26	20	653.8413	2
					71	924.4711	2
<hr/>							
Superoxide dismutase [Cu-Zn]- like							
Spot 10	16.93/6.53	426237454	137	21	46	500.2634	2
					31	469.7566	2
					54	378.9382	4
					60	504.9172	3
<hr/>							
Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B							
Spot 11	24.33/6.55	426249455	366	38	89	790.4163	2

					41	790.9090	2
					43	513.7706	2
					65	577.8568	2
					34	559.2771	3
					39	559.6051	3
					45	541.3038	2
					45	541.8165	2
					43	660.3387	2
					44	447.2285	2
Spot 14	24.46/5.81	157428006	200	16	69	790.4191	2
					84	577.8578	2
					47	541.3223	2
<hr/>							
Peroxiredoxin-6							
Spot 12	29.29/6.62	27807167	737	66	42	714.7000	3
					142	1071.5507	2
					70	682.9991	3
					62	698.3190	2
					56	740.3350	2
					47	529.3025	2
					53	443.2497	3
					40	664.3756	2
					40	664.8700	2
					59	765.4010	2
					27	634.6564	3
					48	511.2912	2
					41	575.3242	2
					48	596.3442	2
					22	607.8737	2
					26	458.2518	2
					34	922.9576	2
Spot 13	29.55/6.16	27807167	481	42	91	1071.5552	2
					48	682.9975	3
					75	682.9989	3
					39	682.9998	3
					39	698.3350	2
					46	529.2692	2
					46	529.7925	2
					51	443.2471	3
					56	664.3745	2
					51	443.5733	3
					56	664.8652	2
					23	765.4005	2
					56	511.2826	3
					37	575.3298	3
					57	596.3119	2
<hr/>							
Guanidinoacetate N-methyltransferase							
Spot 15	30.67/5.66	84370113	435	45	43	582.6185	3
					75	587.9497	3
					39	587.9511	3
					17	711.8851	2
					89	711.8851	2
					64	711.8896	2
					44	862.0765	3
					26	799.4164	3
					22	799.7437	3
					56	845.4091	3
					143	1267.6195	2
					33	1268.1136	2
					36	408.7038	2
					22	459.7709	2

Endoplasmic reticulum resident protein 29							
Spot 16	31.32/5.70	187607549	238	23	37	669.8702	2
					78	875.4265	3
					95	862.8968	2
					31	567.8324	2
Spermidine synthase							
Spot 25	34.55/5.33	426240325	377	28	82	613.3662	2
					74	796.3857	3
					68	687.3438	2
					79	695.3413	2
					28	503.9176	3
					31	755.3767	2
					30	558.3131	2
					32	527.2433	2
					49	560.8109	2
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform							
Spot 26	37.98/5.41	426229540	117	9	82	904.8982	2
					38	896.4287	2
F-actin-capping protein subunit alpha-1							
Spot 27	39.17/5.76	426216254	422	47	30	697.3378	3
					81	599.3539	2
					46	714.3302	3
					30	749.0301	3
					30	749.3520	3
					43	781.8375	2
					60	785.9538	2
					71	846.4120	2
					21	846.9026	2
					64	1027.1292	3
					64	1027.4640	3
Beta-actin							
Spot 28	42.83/5.48	8809716	507	63	38	471.7383	2
					31	651.9830	3
					64	977.5341	2
					78	1067.2146	3
					30	507.7443	2
					27	566.7711	2
					67	895.9514	2
					67	896.4331	2
					38	1083.1625	3
					37	1088.4972	3
					55	389.1805	2
					111	1115.9991	2
					97	744.3620	3
Protein SEC13 homolog							
Spot 29	38.98/5.32	426249673	313	23		578.3297	2
						578.8201	2
						578.8203	2
						591.2813	2
						797.0530	3
						1195.0892	2
						978.9490	2
						868.4045	2
						868.8965	2
Sialic acid synthase							
Spot 31	39.92/4.89	426222271	96	7	49	770.8720	2
					48	711.3723	2
Protein disulfide-isomerase A6 isoform 2							
Spot 32	45.20/5.20	426223140	563	28	26	644.0800	4
					40	606.6446	3

					114	693.8600	2
					55	764.8857	2
					82	764.4315	2
					61	576.2530	2
					58	875.1213	3
					47	875.1216	3
					55	875.1263	3
					32	1312.1896	2
					55	875.4566	3
					42	539.8066	2
					37	540.3067	2
					31	742.3420	2
					91	742.3420	2
<hr/>							
Spermine synthase-like							
Spot 33	40.87/5.17	426220545	134	9	36	483.2303	2
					67	914.5024	2
					32	571.7838	2
<hr/>							
Thioredoxin domain-containing protein 5							
Spot 34	44.08/5.53	426251394	109	5		576.8151	2
						763.3833	2
						540.3176	2
<hr/>							
Adenosylhomocysteinase-like							
Spot 35	44.65/6.12	426241352	601	33	71	579.8148	2
					29	625.9481	3
					23	502.7789	2
					46	756.7109	3
					40	756.7118	3
					25	756.7126	3
					57	523.8010	2
					36	550.2747	3
					60	824.9139	2
					74	628.8565	2
					74	629.3455	2
					43	522.7324	2
					67	567.8097	2
					43	442.7770	2
					47	460.9090	3
					51	690.8806	2
					37	540.2670	2
					28	540.7618	2
<hr/>							
Alpha-enolase isoform 1							
Spot 36	45/6.50	426239774	858	41	61	695.8597	2
					126	902.9699	2
					20	759.7178	3
					53	656.7902	2
					77	749.6483	4
					77	749.8955	4
					55	666.6661	3
					95	999.5007	2
					54	999.9905	2
					22	572.3138	2
					83	786.8868	2
					43	720.8675	2
					79	1017.0401	2
					102	817.4154	2
					58	817.9116	2
					46	771.9147	2
					66	519.9247	3
					37	452.7245	2
<hr/>							
Rab GDP dissociation inhibitor beta							

Spot 37	47.88/6.18	240849297	489	30	57	758.3754	3
					40	535.2781	2
					60	555.3057	2
					28	563.2883	2
					39	563.2883	2
					55	666.0008	3
					62	998.5057	2
					29	611.8129	2
					33	590.3515	2
					50	732.3576	3
					46	648.8591	2
					60	683.3559	2
					46	683.3577	2
					56	562.2262	3
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase							
Spot 38	49.62/5.74	426219121	447	21	46	606.8024	2
					46	393.2479	2
					44	702.3576	2
					36	606.3741	2
					62	721.3408	2
					50	725.3494	2
					42	770.8950	2
					109	770.8955	2
					48	771.3961	2
					42	622.3337	2
					18	730.3105	2
Spot 44	49.01/5.63	426219121	277	15	45	606.8006	2
					56	606.3685	2
					36	721.3424	2
					50	725.3806	2
					30	483.5972	3
68	770.8952	2					
Immunoglobulin alpha heavy chain							
Spot 39	52.75/5.27	2582411	110	4	27	598.2936	2
					83	620.8288	2
Transitional endoplasmic reticulum ATPase							
Spot 40	149.6/5.4	426222300	1181	36	64	1085.5720	2
					69	526.2651	2
					28	592.9816	3
					46	474.2843	2
					33	501.7694	2
					36	419.2700	2
					46	758.3753	3
					26	1137.0700	2
					80	538.2695	2
					64	906.0021	2
					73	906.0073	2
					75	723.9186	2
					41	723.9197	2
					41	724.4003	2
					43	621.8211	2
					40	547.8292	2
					102	833.4362	3
					29	608.6440	3
					54	626.3132	2
					49	976.4688	2
55	962.4853	2					
45	962.9777	2					
26	848.4205	2					

					31	856.9139	2
					18	840.1480	3
					58	778.9348	2
					37	779.4264	2
					65	908.8999	2
					73	481.7433	2
					26	402.8486	3
<hr/>							
Serum albumin							
Spot 41	68.06/5.84	57164373	1096	36	34	473.9016	3
					71	710.3543	2
					19	516.5955	3
					30	774.3937	2
					28	457.2434	2
					32	630.3141	3
					28	944.9733	2
					27	448.7233	2
					22	395.2393	2
					80	798.3933	2
					69	798.3937	2
					53	480.6075	3
					60	642.3611	2
					46	744.8067	2
					35	653.3541	2
					44	752.3961	2
					79	542.6428	3
					120	813.4638	2
					65	749.4202	2
					106	870.9194	2
					63	871.4154	2
					21	449.7396	2
					51	570.2468	2
					48	640.0618	4
					71	853.0833	3
					51	571.8644	2
					42	708.3519	2
					42	708.8507	2
					49	568.2792	2
Spot 42	73.58/5.79	57164373	1039	34	31	473.9034	3
					52	710.3543	2
					38	516.5951	3
					85	774.3926	2
					32	682.3470	3
					40	630.3132	3
					23	944.9720	2
					28	448.7221	2
					38	395.2362	2
					35	479.5520	3
					32	718.8290	2
					21	479.8796	3
					26	971.4803	2
					65	798.3935	2
					54	798.3964	2
					53	480.6054	3
					50	642.3621	2
					20	652.8874	2
					28	653.3613	2
					28	653.8613	2
					100	752.3825	2
					44	501.9296	3
					41	542.6456	3

					41	542.9738	3
					53	749.9095	2
					98	870.9137	3
					46	580.9469	3
					79	853.0798	2
					38	571.8637	2
					36	507.8107	2
					56	700.3531	2
					73	708.3521	2
Spot 43	79.31/5.92	57164373	1385	38	24	725.7855	2
					69	710.3453	2
					37	473.9012	3
					89	774.3850	2
					47	516.5925	3
					39	630.3101	3
					39	448.7151	2
					38	395.2265	2
					26	479.8817	3
					53	506.9215	3
					36	798.3943	2
					20	798.3947	2
					63	798.3949	2
					68	798.3951	2
					55	480.6086	3
					69	642.3616	2
					50	653.3164	2
					99	752.3831	2
					120	813.4406	2
					68	542.6367	3
					66	813.9525	2
					70	749.3980	2
					104	870.9092	2
					68	871.4173	2
					35	570.2470	2
					72	853.0870	3
					58	571.8645	2
					40	507.7919	2
					31	507.8174	2
					40	508.3068	2
					31	508.3074	2
					99	700.3522	2
					74	708.3071	2
					77	568.2817	2
<hr/>							
Protein disulfide-isomerase A3							
Spot 45	59.44/6.13	251823897	905	38	74	596.3057	2
					53	484.2864	2
					36	616.3064	3
					48	711.8503	2
					24	458.2448	3
					51	686.8664	2
					51	716.5969	4
					25	955.4598	3
					42	810.3978	2
					36	810.3989	2
					45	810.4000	2
					41	810.4002	2
					32	450.7544	2
					91	864.4370	3
					47	864.4377	3
					59	586.7759	2

					63	594.7632	2
					63	680.8300	2
					69	506.2519	2
					88	758.8787	2
					64	917.4522	2
					52	671.3482	2
					57	607.8175	2
					36	790.4226	2
<hr/>							
Retinal dehydrogenase 1							
Spot 46	53.20/6.33	57526379	160	7	49	639.8237	2
					71	789.8695	2
					40	823.4117	2
Spot 47	52.67/6.59	57526379	726	33	22	539.9379	3
					64	595.3116	2
					46	415.2401	2
					70	859.4212	2
					70	859.9197	2
					38	485.7087	2
					87	789.8691	2
					45	1023.8402	3
					71	548.2835	2
					58	494.2902	2
					87	1003.9655	2
					59	717.8717	2
					81	1031.0056	2
<hr/>							
Serotransferrin							
Spot 48	97/6.60	426218284	393	15	81	698.8532	2
					23	699.3452	2
					27	552.7683	2
					40	701.3156	2
					46	578.7714	2
					46	579.2654	2
					37	680.8300	2
					44	783.9079	2
					35	549.2568	2
					35	983.4439	2
					53	733.8281	2

¹Valores experimentais foram deduzidos do respectivo mapa 2D pelo software PDQuest.

²Os números sobrescritos entre parênteses referem-se à posição de cada peptídeo dentro da sequência de aminoácidos da proteína completa, de acordo com a busca no banco de dados Mascot.

ANEXO E - TABELA 5. PROTEÍNAS DO FLUIDO DA CADA DO EPIDÍDIMO DE CARNEIROS MORADA NOVA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS. OS SPOTS NUMERADOS SE REFEREM AOS SPOTS MOSTRADOS NA FIGURA 1.

Protein	Experimental¹ kDa/pI	NCBIprot or SwissProt	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Ion score	m/z	z
Spermadhesin-1-like							
Spot 1	14.40/6.50	XP_004020294.1	92	18	47	563.3036	2
					47	563.7927	2
					45	622.2688	2
Epididymal secretory protein E1							
Spot 2	17.88/6.80	XP_004010837	347	41	39	422.8879	3
					31	634.3225	2
					43	496.7422	2
					51	758.3544	2
					28	812.4157	3
					34	812.4167	3
					59	812.4194	3
					27	812.7468	3
					28	812.7491	3
					34	812.7512	3
					33	666.8384	2
					75	666.8398	2
					74	666.8408	2
					86	666.8411	2
					75	666.8412	2
					36	577.6252	3
					28	577.6268	3
					58	577.6276	3
					23	865.9420	3
					69	865.9455	3
					28	577.9550	3
					36	577.9560	3
					23	866.4351	3
Epididymal-specific lipocalin-5-like isoform X1							
Spot 3	20.10/6.80	XP_012016367.1	249	25	36	531.3040	2
					25	568.7927	2
					62	568.8152	2
					62	568.8160	2
					49	568.8171	2
					71	453.4966	4
					34	604.3302	3
					59	604.3336	3
					42	843.9451	2
					50	562.9795	3
					40	843.9683	2
					80	843.9689	2
					29	844.4579	2
					80	844.4592	2
					40	844.4614	2
Spot 7	21.92/6.46	XP_012016367.1	386	29	42	393.7224	2
					52	531.2985	2
					63	568.8172	2
					82	843.9548	2
					43	562.9788	3

					71	453.4853	4
					59	604.3329	3
					22	725.1011	4
					22	966.4689	3
					52	761.1245	4
Spot 8	21.91/6.44	XP_012016367.1	300	25	39	531.3047	2
					49	393.7218	2
					58	568.8021	2
					47	568.8151	2
					62	568.8161	2
					50	568.8162	2
					50	568.8168	2
					71	453.4967	4
					29	604.3320	3
					59	604.3324	3
					56	843.9448	2
					43	562.9790	3
					79	844.4587	2
Spot 9	20.99/6.37	XP_012016367.1	165	20	38	568.8162	2
					28	568.8174	2
					47	604.3316	3
					25	843.9711	2
					27	843.9712	2
					79	843.9748	2
					24	844.4694	2
Spot 10	21.16/6.19	XP_012016367.1	253	25	50	531.3043	2
					51	568.3295	2
					24	568.8041	2
					62	568.8151	2
					62	568.8156	2
					62	568.8165	2
					51	568.8230	2
					47	453.4978	4
					59	604.3309	3
					63	843.9384	2
					43	562.9782	3
					82	843.9705	2
					27	844.4594	2
					26	844.4600	2
					82	844.4601	2
Spot 11	22.92/6.14	XP_012016367.1	374	39	36	761.1228	4
					27	729.1011	3
					47	531.3044	2
					46	393.7224	2
					58	568.8034	2
					62	568.8163	2
					62	568.8164	2
					50	568.8165	2
					50	568.8172	2
					59	604.3215	3
					68	453.4942	4
					30	604.3325	3
					60	843.9608	2
					88	843.9608	2
					51	562.9795	2
					26	844.4322	2
					47	844.4604	2
Spot 15	23.40/5.80	XP_012016367.1	255	25	44	531.3040	2
					30	568.8118	2
					62	568.8153	2

					62	568.8155	2
					50	568.8156	2
					30	569.3147	4
					70	453.4963	4
					62	604.3308	3
					29	604.3327	3
					48	843.9674	2
					79	843.9697	2
					46	844.4594	2
					44	844.4611	2
					67	844.4619	2
Spot 17	23.88/5.48	XP_012016367.1	256	25	40	531.3040	2
					24	568.7938	2
					49	568.8154	2
					62	568.8157	2
					58	568.8165	2
					73	453.4967	4
					29	604.3304	3
					56	604.3331	3
					46	843.9503	2
					45	562.9786	3
					81	843.9702	2
					26	843.9708	2
					26	844.4589	2
					81	844.4608	2
Spot 18	24.50/5.22	XP_012016367.1	259	38	22	729.0989	2
					37	531.3033	2
					58	568.8101	2
					23	568.8136	2
					63	568.8140	2
					50	568.8163	2
					26	568.8180	2
					69	453.4949	4
					40	604.3298	3
					60	604.3309	3
					61	843.9696	2
					68	844.4534	2
Epididymal secretory glutathione peroxidase							
Spot 4	20.57/6.90	NP_001254812.1	230	36	25	789.3812	2
					71	755.8948	2
					71	756.3883	2
					26	657.6742	3
					26	810.3491	2
					26	541.2367	3
					31	642.3351	2
					44	651.8486	2
					51	651.8489	2
Spot 5	21.57/6.75	NP_001254812.1	300	40	42	789.3810	2
					86	789.3863	2
					62	755.8926	2
					55	756.3844	2
					29	657.6747	3
					29	658.0014	3
					23	658.0041	3
					17	810.3500	2
					19	540.9096	3
					30	642.3331	2
					38	651.8425	2
					20	651.8502	2
					36	470.7439	2

Spot 6	23.59/6.69	NP_001254812.1	232	36	36	789.8735	2					
					57	755.8943	2					
					57	756.3841	2					
					28	657.6736	3					
					27	810.3495	2					
					27	541.2375	3					
					39	651.8477	2					
					30	651.8509	2					
					48	651.8509	2					
					36	470.7444	2					
Inactive ribonuclease-like protein 9												
Spot 12	21.31/5.94	XP_012036469.1	235	23	32	694.8619	2					
					61	702.8570	2					
					64	702.8589	2					
					84	702.8603	2					
					33	870.9196	2					
					67	760.3642	4					
					45	970.7901	3					
					50	971.1190	3					
					Spot 13	21.36/5.71	XP_012036469.1	196	23	62	702.8567	2
										82	702.8589	2
82	702.8591	2										
35	870.9197	2										
28	760.3646	4										
Spot 14	21.60/5.55	XP_012036469.1	114	16	50	970.7913	3					
					84	702.8606	2					
					30	970.7895	3					
Binder of sperm 5												
Spot 14	21.60/5.55	NP_001087251.1	181	19	56	764.8258	2					
					32	764.8260	2					
					27	569.7623	2					
					44	569.7632	2					
					23	569.7645	2					
					27	570.2803	2					
					23	570.7725	2					
					39	645.7666	2					
					43	727.2999	2					
					Prostaglandin-H2 D-isomerase							
Spot 16	27.43/5.82	NP_001009257.1	184	14	108	740.8460	2					
					96	740.8612	2					
					94	740.8632	2					
					40	768.9007	2					
					69	768.9007	2					
					66	768.9228	2					
					75	768.9229	2					
					70	768.9237	2					
					76	768.9238	2					
					Clusterin isoform X1							
Spot 19	22.02/5.21	XP_004004480.1	276	19	64	551.8224	2					
					76	714.3298	2					
					28	698.8201	2					
					36	656.2990	3					
					42	656.2996	2					
					36	656.6304	2					
					41	519.2575	2					
					24	519.2824	2					
					20	519.7782	2					
					41	519.7782	2					
Spot 27	30.35/4.89	XP_004004480.1	361	12	24	1014.1731	3					
					45	615.8710	2					

					55	551.8218	2
					53	615.3543	2
					50	410.9119	3
					29	615.8715	2
					39	729.8137	4
					45	733.8125	4
					55	614.9242	3
					88	706.3311	2
					68	714.3290	2
					93	714.3299	2
					80	714.3301	2
					72	714.3306	2
					20	519.2840	2
Spot 30	32.62/5.28	XP_004004480.1	237	19	49	714.3294	2
					50	656.3002	3
					31	656.3012	3
					26	656.3032	3
					44	656.3032	3
					23	983.9574	2
					31	656.6241	3
					59	1154.5497	2
					47	519.2651	2
					47	519.7779	2
Spot 31	33.93/5.28	XP_004004480.1	352	21	32	1014.1716	3
					60	615.8704	2
					54	551.8224	2
					74	714.3297	2
					40	656.3019	3
					53	1154.5529	2
					40	519.2697	2
					33	519.2828	2
					27	519.2838	2
					40	519.7795	2
					34	1014.1690	3
Spot 32	33.69/5.11	XP_004004480.1	444	25	34	1014.5006	3
					74	615.8698	2
					63	551.8222	2
					82	714.3311	2
					32	659.6417	3
					50	656.2931	3
					23	656.2987	3
					24	656.3004	3
					33	983.9562	2
					24	656.6270	3
					23	656.6296	3
					51	1153.5461	2
					42	519.2814	2
					30	519.7784	2
					51	1014.1714	3
Spot 33	32.62/5.0	XP_004004480.1	235	15	31	1014.4998	3
					75	714.3299	2
					41	656.3000	3
					35	1154.0609	2
					43	763.8993	2
					42	519.2820	2
Spot 34	34.13/4.96	XP_004004480.1	230	16	66	551.8242	2
					50	656.3016	3
					43	763.8996	2
					49	519.2783	2
					22	1014.1747	3

Spot 35	31.50/4.94	XP_004004480.1	303	19	57	551.8228	2
					75	714.3303	2
					48	656.3016	3
					54	763.9010	2
					47	519.2806	2
Spot 36	36.40/4.82	XP_004004480.1	261	13	22	1014.1712	3
					58	551.8242	2
					83	714.3298	2
					46	656.3023	3
					40	763.9009	2
Spot 37	36.95/4.69	XP_004004480.1	460	28	34	519.2831	2
					51	615.8718	2
					57	551.8232	2
					43	614.9250	3
					48	706.3322	2
					82	714.3303	2
					49	659.3105	3
					49	659.6433	3
					52	656.3018	3
					33	983.9569	2
					36	1154.0612	2
					35	511.2865	2
					47	519.2680	2
					47	519.7784	2
					46	1014.1746	3
Spot 38	37.82/4.58	XP_004004480.1	276	19	21	1014.5003	3
					64	551.8224	2
					76	714.3298	2
					28	698.8201	3
					36	656.2990	3
					42	656.2996	3
					36	656.6304	3
					41	519.2575	2
					24	519.2824	2
					20	519.7782	2
					41	519.7782	2
					24	1014.1731	3
					50	696.7079	3
Spot 39	38.52/4.46	XP_004004480.1	234	17	62	714.3303	2
					35	656.2994	3
					52	656.3005	3
					35	656.6294	3
					50	763.8996	2
					41	519.2795	2
					35	519.2827	2
Spot 40	39.29/4.36	XP_004004480.1	155	8	28	1014.1709	3
					68	714.3292	2
					44	656.3013	3
Spot 41	40.32/4.26	XP_004004480.1	325	23	43	519.2800	2
					52	551.8226	2
					37	614.9240	3
					59	706.3323	2
					83	714.3308	2
					27	659.6426	3
					47	656.3003	3
Spot 42	41.10/4.19	XP_004004480.1	409	25	43	519.2746	2
					43	519.7787	2
					37	1014.1737	3
					60	551.8218	2

					47	733.8131	4
					38	614.9259	3
					67	706.3336	2
					77	714.3292	2
					25	659.6399	3
					50	659.6409	3
					50	656.2990	3
					29	656.3009	3
					29	656.6283	3
					23	519.2628	2
					48	519.2811	2
					24	519.2824	2
					23	519.7783	2
					38	1014.1708	3
					20	1014.4949	3
					26	1014.5013	3
Spot 43	44.44/4.22	XP_004004480.1	239	12	52	551.8228	2
					49	614.9237	3
					55	706.3330	2
					88	714.3280	2
					42	714.3289	2
					50	714.3299	2
					42	714.8163	2
					50	659.3115	3
					50	659.6427	3
Spot 44	43.28/4.29	XP_004004480.1	247	13	54	551.8231	2
					47	614.9262	3
					75	706.3355	2
					47	714.3291	2
					33	714.3294	2
					45	714.3296	2
					44	714.3298	2
					48	659.3133	3
					33	659.6395	3
					27	455.2456	2
Spot 45	42.51/4.36	XP_004004480.1	341	14	53	551.8207	2
					62	615.8723	2
					66	614.9243	3
					94	706.3337	2
					40	714.3294	2
					44	714.3295	2
					38	714.3306	2
					75	714.3319	2
					45	659.3132	3
					33	659.6409	3
					39	659.6418	3
					28	455.2459	2
Spot 47	41.80/4.44	XP_004004480.1	245	12	62	551.8224	2
					41	614.9256	3
					88	714.3294	2
					36	714.3303	2
					54	659.3141	3
					23	659.6413	3
					54	659.6464	3
Coactosin-like protein							
Spot 20	16.48/5.12	NP_001040058.1	240	45	48	1031.1271	3
					39	673.7009	3
					31	601.9963	3
					54	902.4910	2
					42	902.4927	2

					54	902.9882	2
					46	433.2271	2
					52	753.8928	2
Double-headed protease inhibitor, submandibular gland							
Spot 21	21.81/4.83	XP_005683401.1	175	33	60	641.3191	2
					60	641.8076	2
					31	879.3620	2
					84	879.3620	2
					30	879.8543	2
					33	879.8543	2
					32	1067.9850	2
					32	1068.4773	2
Spot 22	22.02/4.63	XP_005683401.1	161	33	37	641.8092	2
					89	879.3624	2
					43	879.8546	2
					32	879.8546	2
					32	879.8613	2
					17	1060.4783	2
					22	1067.9825	2
					22	1068.4857	2
					35	712.9885	3
					22	1068.9800	2
Spot 23	22.33/4.40	XP_005683401.1	136	19	46	641.8109	2
					89	879.3642	2
					26	879.8558	2
Spot 24	22.10/4.62	XP_004009573.1	135	29	59	467.9026	3
					28	879.3626	2
					73	1060.4801	2
Spot 25	22.06/4.95	XP_004009573.1	104	21	76	879.3618	2
					26	879.8545	2
					28	712.9873	3
14-3-3 protein epsilon-like isoform X2							
Spot 26	28.53/4.80	XP_014945814.1	148	12	34	454.2612	2
					33	454.7593	2
					65	628.8032	2
					45	595.3355	2
					50	603.3329	2
Testis-expressed sequence 101 protein							
Spot 28	27.60/5.18	XP_012017986.1	176	20	95	777.3878	2
					42	777.8796	2
					24	924.0678	3
					57	804.9016	2
Spot 29	27.47/5.34	XP_012017986.1	226	27	24	1017.0107	2
					33	1017.5048	2
					85	777.3890	2
					80	777.8801	2
					51	924.0712	3
					57	804.9032	2
Reticulocalbin-1 isoform X1							
Spot 46	44.04/4.53	XP_014956238.1	488	28	52	642.8021	2
					67	642.8041	2
					60	523.9155	2
					47	703.6831	2
					74	813.3841	
					24	477.7315	2
					50	632.2974	2
					79	758.4141	2
					40	485.2263	2
					40	485.7191	2
					47	650.6445	2

Sex hormone-binding globulin isoform X1							
Spot 48	57.63/4.40	XP_004012717.1	173	9	68	721.9249	2
					31	669.3867	2
					74	629.8738	2
Galectin-3-binding protein isoform X2							
Spot 49	97.92/4.14	XP_011964938.1	631	25	41	523.9274	3
					30	526.9584	3
					55	789.3881	2
					83	797.3825	2
					59	797.3825	2
					49	552.3262	2
					42	474.2742	2
					68	741.4044	2
					61	734.4378	2
					75	1186.0406	2
					94	730.8389	2
					40	640.9873	3
					50	770.3886	2
					22	770.8810	2
Spot 50	95.11/4.20	XP_011964938.1	654	25	55	836.7678	3
					43	523.9276	3
					31	526.9578	3
					75	789.9396	2
					43	789.3859	2
					61	797.3831	2
					48	552.3256	2
					43	474.2752	2
					54	741.4080	2
					91	741.4080	2
					61	734.4459	2
					35	734.4481	2
					100	730.8395	2
					32	641.3147	3
					47	770.3889	2
Spot 51	92.05/4.27	XP_011964938.1	599	21	41	523.9270	3
					31	526.9577	3
					62	789.9385	2
					69	797.3820	2
					67	552.3258	2
					48	474.2745	2
					77	741.4065	2
					61	734.4444	2
					94	730.8392	2
					38	641.3163	3
					44	770.3897	2
Alpha-1-antitrypsin							
Spot 52	75.08/4.75	NP_001009799.1	224	14	43	589.8206	2
					51	659.3286	2
					55	584.8099	2
					48	536.3128	2
					27	1120.0560	2
					55	536.3127	2
Spot 53	74.12/4.81	NP_001009799.1	98	4	49	589.8228	2
					49	536.3153	2
Spot 54	73.14/4.88	NP_001009799.1	185	9	42	589.8214	2
					52	659.3268	2
					36	584.8123	2
Beta-galactosidase isoform X2							
Spot 55	68.66/5.27	XP_012013743.1	127	3	26	634.3539	2
					103	781.4254	2

Spot 79	84.93/6.49	XP_012013743.1	710	24	48	781.9160	2
					46	781.9168	2
					43	621.8199	2
					79	844.7534	3
					73	845.0815	3
					57	640.8059	2
					18	759.3675	3
					61	609.8415	2
					22	609.8424	2
					85	863.9623	2
					28	864.4522	2
					51	634.3511	2
					37	596.8124	2
					95	781.4246	2
					45	781.9160	2
					50	781.9172	2
					95	781.9231	2
					65	660.3179	2
					74	1020.1715	3
					Spot 80	86.30/6.44	XP_012013743.1
57	414.8762	3					
35	621.8196	2					
96	844.7456	3					
38	844.7463	3					
47	844.7493	3					
62	845.0744	3					
29	845.0775	3					
47	845.0819	3					
38	845.0848	3					
63	640.7995	2					
24	759.3673	3					
24	759.6965	3					
58	609.8412	2					
61	609.8417	2					
70	609.8423	2					
102	863.9552	2					
47	863.9603	2					
28	864.4476	2					
73	634.3307	2					
35	634.3564	2					
38	596.7982	2					
39	596.8131	2					
39	597.3071	2					
44	619.7923	4					
34	781.4103	2					
33	781.4166	2					
60	781.4227	2					
78	781.4249	2					
40	781.9152	2					
37	781.9153	2					
60	781.9156	2					
42	781.9157	2					
33	781.9168	2					
34	781.9181	2					
78	781.9234	2					
66	660.3059	2					
58	660.8124	2					
34	574.3162	2					
71	1020.1655	3					
45	1020.1683	3					

					124	1020.1712	3
					45	1020.4986	3
					45	680.8613	2
					45	681.3450	2
					29	681.3514	2
Spot 81	87.54/6.42	XP_012013743.1	698	23	82	844.7546	3
					56	640.8047	2
					43	759.3684	3
					38	609.8415	2
					56	609.8417	2
					61	609.8421	2
					79	863.9611	2
					30	864.4536	2
					55	634.3493	2
					45	596.8135	2
					37	597.3069	2
					104	781.4243	2
					54	781.9146	2
					40	781.9168	2
					104	781.9228	2
					65	660.3192	2
					42	1020.1722	3
					66	681.3555	2
Spot 82	88.72/6.32	XP_012013743.1	653	22	58	414.8777	3
					40	621.8180	2
					68	844.7534	3
					58	845.0818	3
					66	640.8002	2
					59	609.8408	2
					60	609.8412	2
					55	609.8417	2
					40	609.8419	2
					26	609.8419	2
					69	863.9608	2
					31	864.4526	2
					34	634.3398	2
					55	634.3531	2
					33	634.3539	2
					41	596.8126	2
					50	596.8134	2
					50	597.3080	2
					52	781.9135	2
					39	781.9141	2
					33	781.9144	2
					51	781.9144	2
					49	781.9165	2
					65	660.3145	2
					23	660.8104	2
					60	1020.1714	3
					52	680.8618	2
					52	681.3524	2
Spot 85	42.89/5.89	XP_012013743.1	225	6	64	863.9579	2
					55	634.3524	2
					51	596.8150	2
					57	660.3190	2
<hr/>							
Carboxypeptidase Q isoform X2							
Spot 56	58.20/5.57	XP_012039490.1	556	30	56	658.8576	2
					45	547.3166	2
					38	577.3503	2

					86	577.3533	2
					68	577.3536	2
					50	602.3268	2
					30	469.5795	3
					52	703.8712	2
					45	617.2940	2
					64	617.2944	2
					70	450.2847	2
					65	450.2877	2
					57	928.4208	2
					36	928.9138	2
					48	951.4479	2
					28	836.4235	3
<hr/>							
High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I							
Spot 57	42.06/5.43	NP_001132924.1	75	5	37	629.3665	2
					39	521.3118	2
<hr/>							
Actin							
Spot 58	41.98/5.52	AAA20649.1	99	40	51	599.2844	2
					41	581.3142	2
					48	589.3019	2
Spot 59	42.13/5.57	AAA20649.1	91	40	46	599.2846	2
					46	581.3144	2
					43	589.3000	2
					31	589.3129	2
<hr/>							
Plasma alpha-L-fucosidase							
Spot 60	54.87/5.79	XP_011976964.1	149	9	27	502.7673	2
					47	550.2825	2
					37	941.4663	2
					37	682.8625	2
Spot 61	53.42/5.89	XP_011976964.1	352	18	24	502.7661	2
					53	550.2796	2
					33	550.2808	2
					41	1118.5245	2
					62	941.4636	2
					41	941.9553	2
					28	941.9570	2
					41	682.8617	2
					24	682.8646	2
					24	683.3550	2
					56	622.3453	2
					75	735.9117	2
<hr/>							
Serum albumin							
Spot 62	74.04/6.14	NP_001009376.1	1121	33	35	473.9002	3
					48	710.3524	2
					30	457.2427	2
					43	630.3132	3
					24	874.3604	2
					38	583.8909	3
					72	798.3947	2
					47	480.6059	3
					38	480.6073	3
					52	642.3604	2
					47	744.8057	2
					45	653.3633	2
					113	752.3911	3
					68	542.6444	3
					106	813.4686	2
					40	542.9723	3
					71	813.9602	2

					55	749.4197	2
					63	870.9218	2
					58	870.9244	2
					110	870.9247	2
					58	871.4174	2
					43	640.0603	4
					69	853.0816	3
					29	853.4094	3
					57	571.8621	2
					33	508.3064	2
					99	700.3539	2
					33	700.8456	2
					92	708.3489	2
					26	708.8432	2
					38	568.2788	2
Spot 63	81.52/6.04	NP_001009376.1	1584	46	36	473.8984	3
					64	710.3526	2
					49	739.7702	2
					37	516.5944	3
					68	774.3942	2
					32	630.3131	3
					27	874.3611	2
					52	583.8908	3
					59	875.3392	2
					25	479.5527	3
					27	719.3231	2
					80	746.1080	2
					43	971.4812	2
					74	798.3944	2
					56	798.3948	2
					65	798.3950	2
					67	798.3956	2
					51	480.6049	3
					32	480.6059	3
					31	480.6075	3
					64	642.3631	2
					29	744.8063	2
					56	744.8068	2
					27	744.8085	2
					71	776.8433	2
					54	653.3633	2
					35	653.8389	2
					87	752.4009	2
					30	502.2570	3
					34	752.8865	2
					71	542.6414	3
					120	813.4586	2
					40	542.9727	3
					70	813.9585	2
					92	749.4102	2
					30	749.9110	2
					104	870.9105	2
					44	580.9462	3
					43	870.9167	2
					63	870.9188	2
					64	870.9222	2
					67	870.9227	2
					63	871.3959	2
					67	871.4172	2
					64	871.4226	2

					54	569.2404	2
					56	569.7557	2
					32	640.0610	4
					54	853.0814	3
					65	571.8599	2
					38	507.8035	2
					42	508.3039	2
					38	508.3086	2
					99	700.3430	2
					99	700.3543	2
					45	700.8430	2
					78	708.3483	2
					41	708.8423	2
					55	568.2803	2
Spot 64	76.21/5.97	NP_001009376.1	1308	45	32	473.9012	3
					51	710.3535	2
					40	739.7696	2
					21	774.3967	2
					37	682.3468	3
					32	630.3136	3
					38	944.9736	2
					38	874.8524	2
					30	583.8906	3
					32	719.3221	2
					29	746.1075	4
					27	971.4815	2
					35	798.3895	2
					71	798.3926	2
					68	798.3955	2
					60	480.6048	3
					54	480.6067	3
					47	480.6068	3
					47	480.6078	3
					44	642.3635	2
					53	744.8049	2
					32	744.8063	2
					34	653.3619	2
					54	653.8467	2
					32	752.3920	2
					102	542.6450	3
					39	813.4687	2
					68	749.4081	2
					104	870.9103	2
					58	870.9103	2
					102	580.9457	2
					50	871.4049	2
					62	871.4091	2
					42	871.4180	2
					58	569.7556	2
					35	570.2465	2
					34	640.0595	4
					40	853.0803	3
					77	853.4091	3
					34	647.9727	3
					25	571.8562	2
					63	507.8002	2
					26	508.3032	2
					42	508.3063	2
					26	700.3496	2
					99	700.8423	2

					28	708.3482	2
					73	708.8417	2
					26	708.8417	2
Beta-mannosidase							
Spot 65	111.75/5.93	XP_004009715.1	459	11	57	605.8135	2
					54	481.2628	2
					59	661.8491	2
					41	662.3411	2
					62	599.3035	2
					45	836.9602	2
					65	740.3998	2
					95	936.5109	2
					22	653.2898	2
Spot 66	111.51/5.99	XP_004009715.1	532	15	20	711.8772	2
					60	481.2616	2
					59	661.8497	2
					60	599.3063	2
					58	975.5592	2
					46	1149.0960	2
					52	740.4022	2
					52	610.3458	3
					91	936.5116	2
					33	644.8003	2
					33	645.2941	2
					28	653.2924	2
Spot 67	111.22/6.03	XP_004009715.1	554	14	45	471.2285	2
					54	711.8770	2
					59	481.2635	2
					50	661.8489	2
					61	599.3069	2
					77	836.9609	2
					42	837.4522	2
					59	740.4022	2
					28	831.7438	3
					87	936.5122	2
					34	652.7970	2
Alpha-2-macroglobulin isoform X1							
Spot 68	115.47/6.52	XP_012030833.1	533	8	45	554.8012	2
					31	587.8344	3
					68	584.9737	3
					86	716.8644	2
					52	568.3175	2
					36	625.8438	2
					73	722.4180	2
					44	605.3308	2
					66	711.3782	2
					42	703.3788	2
Spot 69	116.85/6.60	XP_012030833.1	690	12	42	554.8005	2
					86	584.9742	3
					74	716.8654	2
					62	568.3160	2
					75	625.8441	2
					76	722.4168	2
					40	722.4174	2
					64	605.3296	2
					57	711.3773	2
					36	703.3811	2
					27	837.9079	4
					41	951.0292	2

Spot 70	108.87/6.51	XP_012030833.1	788	14	58	981.8675	3
					42	554.7985	2
					22	739.3704	2
					30	587.8337	2
					86	584.9741	3
					40	585.3012	3
					87	716.8648	2
					54	717.3577	2
					64	568.3164	2
					65	625.8434	2
					74	722.4174	2
					29	722.9100	2
					41	605.8227	2
					51	711.3773	2
49	711.8704	2					
36	703.3795	2					
68	837.6610	4					
68	837.9131	4					
63	951.0306	2					
71	981.8685	3					
Spot 71	97.24/6.51	XP_012030833.1	964	18	45	554.7947	2
					45	554.8003	2
					49	493.2451	3
					66	739.3683	2
					75	862.4539	2
					33	648.8419	4
					22	864.7878	3
					22	865.1218	3
					61	584.9745	3
					30	585.3020	3
					65	716.8630	2
					67	717.3585	2
					63	568.3049	2
					79	625.8310	2
					28	722.4143	2
					33	722.4173	2
					28	722.9049	2
					33	722.9096	2
					46	605.3267	2
					71	605.8215	2
					44	605.8215	2
					54	711.3671	2
					53	711.8695	2
					44	703.3789	2
40	703.3804	2					
62	837.6624	4					
80	951.0164	2					
66	1901.0256	1					
31	951.0296	2					
53	951.0297	2					
59	1090.5510	3					
33	1090.8801	3					
59	1090.8823	3					
56	976.5396	3					
53	981.8595	3					
27	981.8718	3					
27	982.1985	3					
27	596.2794	2					
Spot 72	97.0/6.60	XP_012030833.1	668	12	49	554.7987	2
					28	493.5742	3

					56	584.9745	3
					30	585.3027	3
					67	716.8641	2
					49	568.3144	2
					61	568.3144	2
					83	625.8426	2
					48	605.3286	2
					23	605.8218	2
					58	711.3775	2
					33	711.8698	2
					42	711.8698	2
					32	703.3792	2
					61	837.9085	4
					61	951.0269	2
					76	981.8611	3
					35	981.8665	3
					25	982.1922	3
Spot 73	93.26/6.71	XP_012030833.1	494	9	50	554.7995	2
					30	584.9747	3
					86	716.8646	2
					43	568.3151	2
					45	568.3151	2
					71	625.8417	2
					63	605.3318	2
					40	711.3751	2
					28	711.8718	2
					27	711.8718	2
					36	703.3782	2
					32	951.0267	2
					51	981.8697	3
<hr/>							
Angiotensin-converting enzyme isoform X2							
Spot 74	96.56/6.80	XP_012026792	408	9	37	958.1187	3
					36	647.8186	2
					42	648.3096	2
					55	684.3051	2
					31	684.7975	2
					42	1094.5349	2
					51	1102.5348	2
					39	440.7322	2
					65	762.8505	2
					59	763.3437	2
					37	580.7990	2
					40	643.3577	2
					34	709.8521	2
					42	717.8482	2
<hr/>							
Inhibitor of carbonic anhydrase-like isoform X2							
Spot 75	79.32/6.74	XP_004003380.1	321	11	41	667.3493	2
					45	755.8624	2
					32	726.3983	2
					54	726.4038	2
					69	726.4166	2
					66	699.8464	2
					39	794.3518	2
					63	803.9362	2
Spot 78	82.44/6.64	XP_004003380.1	597	23	47	667.3446	2
					64	755.8533	2
					20	755.8538	2
					42	755.3604	2
					42	755.8616	2
					29	504.2505	3

					46	726.3897	2
					34	726.4009	2
					66	726.4014	2
					62	726.4021	2
					67	726.4027	2
					80	726.4056	2
					45	653.3434	3
					45	909.9206	2
					39	635.6557	3
					69	691.8507	2
					54	699.8409	2
					31	699.8489	2
					38	793.8577	2
					47	794.3491	2
					21	794.3497	2
					67	1012.9749	2
					55	803.9370	2
<hr/>							
Betahexosaminidase subunit beta isoform X1							
Spot 76	69.61/6.73	XP_004016931.1	613	31	20	666.6738	3
					30	703.3494	2
					75	703.3494	2
					41	637.8102	2
					40	537.7804	2
					53	437.7551	2
					31	513.7520	2
					34	624.3013	4
					42	832.0715	3
					42	832.3948	3
					34	624.5505	4
					34	576.6172	3
					37	743.3512	3
					62	784.3706	2
					63	784.3719	2
					55	620.3789	2
					83	585.2504	2
					83	585.7499	2
					41	878.9499	2
Spot 77	66.66/6.64	XP_004016931.1	678	33	40	666.6744	3
					69	703.3504	2
					104	703.3512	2
					44	637.8108	2
					57	437.2495	2
					57	437.7558	2
					31	513.7509	2
					34	624.3031	4
					43	624.3031	4
					46	832.0709	3
					34	576.6167	3
					52	743.3510	3
					32	784.3701	2
					71	784.3718	2
					32	784.8643	2
					55	620.3784	2
					67	585.2502	2
					43	878.9446	2
					35	635.9675	3
<hr/>							
Alpha-enolase isoform X3							
Spot 83	44.69/6.54	XP_004013794.1	507	22	74	695.8667	2
					113	902.981	2
					42	666.6646	3

					88	999.4991	2
					84	999.9935	2
					34	572.3135	2
					52	786.8947	2
					46	720.8700	2
					101	817.4169	2
<hr/>							
Cysteine-rich secretory protein 1 isoform X1							
Spot 84	35.01/6.04	XP_004018932.2	89	12	41	988.8259	3
					71	988.8282	3
					42	989.1570	3
					18	667.8283	2

¹Valores experimentais foram deduzidos do respectivo mapa 2D pelo software PDQuest.

²Os números sobrescritos entre parênteses referem-se à posição de cada peptídeo dentro da sequência de aminoácidos da proteína completa, de acordo com a busca no banco de dados Mascot.

**ANEXO F - TABELA 6. PROTEÍNAS DA MEMBRANA DO ESPERMATOZOIDE
EJACULADO IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS. OS SPOTS
NUMERADOS SE REFEREM AOS SPOTS MOSTRADOS NA FIGURA 1.**

Protein	Experimental ¹ kDa/pI	NCBI nr accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Ion score	m/z	z
Bodhesin							
Spot 1	13.74/4.5	77864607	78	9	78	548.2709	2
Tubulin beta3 chain isoform							
Spot 2	18.05/4.0	803189444	133	7	67 66	937.4766 623.3018	2 2
ATP synthase subunit delta, mitochondrial							
Spot 3	18.05/4.0	28603800	113	13	81 58 33	716.3480 716.8543 493.7786	2 2 2
Binder of sperm 1							
Spot 4	16.34/5.0	219521810	235	65	18 40 39 83 92 29 24 49 21 62 28 49	821.6842 740.6349 1110.4670 697.5582 929.7467 740.3180 740.6593 1236.5477 1236.5477 824.7171 825.0446 1337.0754	3 3 2 4 3 3 3 2 2 3 3 3 2
Spot 5	15.49/5.14	219521810	71	45	25 21 29	740.6432 740.3284 1236.5835	3 3 2
Spot 6	15.08/5.14	219521810	98	45	18 33 29 32 20 16 49 20	740.6399 740.6416 740.9649 1110.9617 740.3291 740.6563 1236.5800 1237.0729	3 3 3 2 3 3 2 2
Spot 7	15.03/5.40	219521810	133	45	41 35 60 49	740.6427 1109.9989 824.7149 1236.5707	3 2 2 2
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial							
Spot 8	15.48/5.59	926718816	402	15	46 40 35 64 81 66 72	452.2445 513.9360 554.7920 756.3297 737.4280 549.9604 829.4202	3 3 2 3 2 3 2
Ropporin-1							
Spot 9	14.38/5.71	115495919	122	14	37 43 50 79	842.4745 842.9678 589.9480 884.4263	2 2 3 2

Acrosin-binding protein isoform X1							
Spot 10	14.40/6.50	426225664	94	4	53	769.7399	3
					90	769.7470	3
					94	770.0685	3
Spot 11	17.11/6.42	965827780	126	3	82	637.3286	2
					34	637.3357	2
					44	493.2065	2
					23	501.2029	2
MICOS complex subunit Mic60 isoform X3							
Spot 12	17.37/6.48	755517502	78	1	78	527.2649	2
Sperm acrosome membrane-associated protein 1							
Spot 13	20.10/6.4	803269028	263	20	68	730.8582	2
					23	639.3004	3
					91	990.9763	2
					84	990.9768	2
					91	991.4765	2
					56	746.3762	2
					25	730.8574	3
Spot 17	19.94/5.93	803269028	300	23	69	731.3496	2
					26	638.9718	3
					76	639.3042	3
					43	639.3042	3
					41	428.5426	3
					29	990.9749	2
					73	990.9785	2
					61	991.4694	2
					65	991.4757	2
					73	746.3762	2
					54	746.3713	2
					39	746.3763	2
					39	746.8673	2
Spot 20	25.17/4.54	803099045	208	14	27	730.3427	2
					75	730.8585	2
					25	730.8590	2
					27	731.3499	2
					69	990.9732	2
					75	990.9765	2
					75	991.4641	2
					69	991.4653	2
					58	746.3776	2
Peroxiredoxin-5, mitochondrial							
Spot 14	18.67/6.32	426251990	396	36	67	695.3660	2
					25	638.9977	3
					37	467.2692	2
					57	804.4199	2
					40	489.9356	3
					50	734.4049	2
					29	490.2643	3
					17	566.7955	2
					69	566.7955	2
					51	705.3784	2
					33	619.3309	2
					28	627.3086	2
					39	627.3269	2
Glutathione transferase M3							
Spot 15	16.59/5.9	78557758	110	26	50	628.3129	2
					26	803.3765	2
					35	660.2609	2
Tubulin beta-7 chain							
Spot 16	16.92/5.82	119923822	79	5	79	905.7712	3

ATP synthase subunit beta, mitochondrial							
Spot 18	23.13/4.99	426224929	392	20	67	994.5284	2
					25	994.5316	3
					70	611.2814	3
					34	611.2916	2
					46	611.2996	3
					34	611.6197	2
					46	611.6244	2
					69	712.3520	2
					68	1068.5267	2
					34	897.7986	3
					96	897.7992	2
					49	669.0143	2
					33	1003.0400	3
					31	669.3504	2
					30	1003.5305	2
					29	1117.5481	3
					42	1117.5557	2
					42	1117.8772	2
					19	1117.8848	3
					29	1117.8857	2
Spot 25	29.77/5.36	426224929	1060	36	38	825.4503	2
					83	825.4797	2
					70	550.9679	2
					83	825.9594	2
					69	631.8256	2
					89	631.8256	2
					55	639.8162	2
					97	639.8162	2
					68	639.8235	2
					98	649.7055	3
					60	519.2676	2
					44	519.7793	2
					60	519.7903	2
					29	519.8034	2
					44	520.2959	2
					60	520.2978	2
					55	701.3278	2
					83	1001.5141	3
					43	544.7938	2
					36	544.8208	2
					39	544.8231	2
					43	545.3109	2
					39	545.3182	2
					54	488.2718	2
					52	729.4273	2
					58	737.4093	3
					27	737.4259	2
					59	737.4265	3
					91	703.8568	2
					52	584.2889	4
					77	778.7186	3
					71	809.4008	2
					102	720.3836	3
					87	718.3604	2
					85	718.3838	2
					59	718.8594	2
					85	718.8779	2
Spot 27	29.80/5.70	426224929	117	6	37	519.2682	2

					25	544.8243	2
					55	720.4036	2
Binder of sperm 5							
Spot 19	22.81/4.85	148225308	160	14	68	764.8270	2
					56	765.3182	2
					38	645.7664	2
					54	727.3002	2
Equatorin isoform X1							
Spot 21	34.04/4.78	803014782	69	3	69	586.2757	2
Dihydropolyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial							
Spot 22	42.28/4.8	803155048	336	9	92	877.9827	2
					111	780.3973	2
					72	780.3977	2
					65	762.4333	2
Spot 46	42.16/4.37	803155048	157	4	22	877.9834	2
					93	877.9840	2
					65	762.4332	2
Spot 51	79.72/5.77	803155048	366	15	95	877.9833	2
					65	762.4345	2
					85	1059.9188	3
					23	524.8059	2
					82	765.9248	2
					36	766.4180	2
					36	618.8486	2
Cytosol aminopeptidase							
Spot 23	33.07/5.16	803082030	228	10	86	616.8406	2
					42	928.9476	2
					34	749.9030	2
					68	597.8229	2
Spot 24	33.11/5.27	803082030	94	4	45	596.3168	2
					38	749.9036	2
					49	750.3951	2
Spot 26	33.01/5.37	803082030	280	15	59	590.8520	2
					34	688.6969	3
					52	616.8431	2
					51	596.3087	2
					28	548.9470	3
					40	822.9218	2
					44	749.9025	2
					29	749.9034	2
Spot 41	67.01/6.05	803082030	834	39	36	475.2910	2
					63	590.8527	2
					39	688.6974	3
					66	616.8445	2
					57	596.3086	2
					17	548.9474	3
					50	749.9024	2
					57	749.9035	2
					62	597.8272	2
					108	855.4199	2
					34	855.9102	2
					25	1134.1038	2
					45	619.3082	2
					67	619.3087	2
					58	403.8562	3
					64	605.2911	2
					40	838.4058	2
					63	584.2949	2
					27	584.7887	2
					29	446.2333	2

Spot 42	67.63/5.91	803082030	541	24	44	519.8044	2
					35	475.2905	2
					47	590.8535	2
					55	596.3143	2
					55	596.3143	2
					38	928.9464	2
					66	750.3950	2
					61	597.8211	2
					72	855.4183	2
					37	855.9110	2
					75	619.3082	2
					52	619.3109	2
					50	838.4062	2
					43	519.8038	2
Spot 43	68.12/5.79	803082030	572	26	35	475.2923	2
					40	688.6969	2
					64	616.8422	3
					53	596.3158	2
					59	749.9024	2
					54	750.3952	3
					61	750.3952	2
					50	597.8238	2
					43	855.4196	2
					32	619.3086	2
					70	619.3086	2
					54	403.8580	2
					51	605.2908	3
					50	584.2962	2
42	519.8026	2					
<hr/>							
Tubulin beta-4A chain isoform X1							
Spot 28	24.26/5.81	803073149	83	3	83	580.3209	2
<hr/>							
Ferritin, mitochondrial							
Spot 29	24.45/6.06	426229307	230	26	50	500.2384	3
					26	500.5668	3
					35	579.2899	2
					26	551.8015	2
					35	782.8933	2
						599.3246	3
<hr/>							
Ferritin light chain							
Spot 30	24.27/6.3	27807407	249	23	73	740.8579	2
					53	741.3492	2
					80	717.8626	2
					97	810.9282	2
					56	811.4183	2
<hr/>							
NADH dehydrogenase 24 kDa subunit (AA 6-217)							
Spot 31	26.75/6.05	1364245	294	36	32	804.3655	3
					55	668.9026	2
					44	668.9041	2
					32	634.8572	2
					45	634.8572	2
					50	634.8574	2
					37	634.8576	2
					27	634.8581	2
					45	635.3514	2
					37	635.3517	2
					32	635.3554	2
					23	836.8923	2
					58	836.8923	2
					61	609.3240	2
43	608.8180	2					

Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform							
Spot 32	31.04/6.5	213972529	78	13	32	612.7892	2
					45	702.8573	2
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial isoform X1							
Spot 33	35.87/5.62	426228398	326	17	24	861.9186	2
					82	862.9106	2
					33	653.8294	2
					82	653.8312	2
					32	654.3211	2
					69	528.2933	3
					100	791.9409	2
					32	528.6224	3
					42	623.3160	2
					38	623.3192	2
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial isoform X1							
Spot 34	40.91/5.62	803185630	718	42	78	775.3482	2
					77	901.4539	2
					54	901.4603	2
					120	917.4674	2
					61	602.7661	2
					58	1170.5743	3
					30	1541.7211	2
					42	1028.4836	3
					37	1028.4846	3
					40	666.3139	2
					105	666.3139	2
					46	617.3177	3
					68	925.4796	2
					49	622.6174	3
					30	622.6477	3
					39	622.6481	3
					68	933.4698	2
					32	882.4432	2
					32	882.4478	2
					32	882.9383	2
					26	882.9400	2
					56	632.8181	2
					23	621.3413	2
Spot 35	40.99/5.50	803185630	653	31	78	775.3476	2
					43	775.3487	2
					45	641.6141	3
					87	901.4598	2
					116	917.4688	2
					49	602.7918	2
					85	666.3164	2
					40	617.3186	3
					45	622.6434	3
					51	933.4769	2
					99	882.4464	2
					45	632.8170	2
Actin-related protein T2							
Spot 36	43.34/5.38	426239824	479	22	80	610.8070	2
					46	647.8055	2
					53	899.4499	2
					86	899.4499	2
					74	899.9422	2
					23	492.7604	2
					42	492.7609	2
					30	387.2235	2
					37	611.3144	2

					68	559.6268	3
					50	559.9549	3
					42	606.2762	2
					35	614.7922	2
					51	518.7746	2
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial isoform X2							
Spot 37	45.0/5.80	426220691	292	15	47	647.8652	2
					80	629.3561	2
					56	680.8749	2
					65	736.8776	2
					44	684.3505	2
Spot 39	45.05/6.0	426220691	167	8	61	629.3558	2
					77	680.8763	2
					28	684.3514	2
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial							
Spot 38	42.98/5.95	211063449	133	3	61	667.8688	2
					41	507.2399	2
					33	602.3068	2
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial							
Spot 40	53.31/6.38	115497690	393	25	35	859.3945	2
					58	558.8192	2
					39	577.3132	2
					42	467.7533	2
					54	617.3290	2
					33	493.2904	3
					35	692.7009	3
					29	515.7654	2
					70	791.9196	2
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial							
Spot 44	60.20/5.56	803186314	813	37	61	1168.0565	3
					61	1168.5562	2
					71	560.9255	3
					61	904.4279	2
					86	1049.5275	3
					86	534.2687	2
					103	620.8257	2
					111	676.3281	2
					65	676.3320	2
					73	676.8242	2
					42	685.3354	2
					56	628.8420	3
					47	550.7926	3
					35	907.4245	3
					53	456.7240	3
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 32 isoform X2							
Spot 45	57.15/4.89	426256426	267	11	22	817.6625	3
					41	957.9251	2
					32	569.7521	2
					26	515.2333	2
					24	515.2346	2
					52	811.4231	2
					35	811.9103	2
					59	811.9103	2
					52	811.9399	2
					45	812.4227	2
					24	812.4321	2
					27	812.4327	2
					37	628.3226	2
					48	478.2487	3
Galectin-3-binding protein isoform X1							

Spot 47	83.50/4.40	803125965	124	4	62	734.4459	2
					62	730.8402	2
Carboxypeptidase Q isoform X1							
Spot 48	60.24/5.45	803106165	510	19	73	658.7685	2
					46	658.8588	2
					42	547.3149	2
					42	547.8095	2
					59	577.3414	2
					74	577.3528	2
					71	577.3545	2
					49	602.3260	2
					38	469.5792	3
					78	703.8710	2
					35	617.2902	2
					68	617.2902	2
					78	450.2833	2
					48	951.4495	2
60 kDa heat shock protein, mitochondrial							
Spot 49	72.76/5.33	426221286	518	24	65	715.7161	3
					77	672.9648	2
					80	854.0888	3
					47	760.8828	2
					48	695.3593	2
					69	635.6890	3
					69	636.0172	3
					82	636.0180	3
					30	451.2729	2
					45	842.9611	2
					46	608.3343	2
Spot 50	72.34/5.40	426221286	677	28	85	715.7149	3
					62	1073.0792	2
					65	716.0434	3
					65	672.8633	2
					84	854.0898	3
					66	752.8864	2
					54	760.8824	2
					36	695.3589	2
					37	800.8699	2
					54	800.8699	2
					32	801.3835	2
					103	635.6883	3
					68	636.0120	3
					47	636.0170	3
					41	636.0170	3
					41	456.7954	2
					36	451.2712	2
					48	842.9606	2
					36	608.3347	2
					63	608.3354	2
					36	608.8342	2
Stress-70 protein, mitochondrial isoform X1							
Spot 52	79.78/5.70	426229624	555	18	92	725.8638	2
					52	785.4259	2
					54	847.9359	2
					56	622.3392	2
					52	1028.9840	2
					71	681.3743	2
					32	681.8699	2
					59	731.8857	2
					49	646.3389	2

					75	796.9837	2
					63	796.9847	2
					52	796.9863	2
					52	797.4722	2
					63	797.4770	2
Spot 53	79.72/5.77	426229624	744	24	46	725.8615	2
					27	784.8934	2
					36	448.2043	3
					77	785.4263	2
					28	785.9189	2
					72	848.4255	2
					78	621.8434	2
					67	622.3369	2
					89	1028.9854	2
					77	681.3762	2
					29	681.8702	2
					50	731.8837	2
					37	646.3376	2
					65	796.9829	2
					88	796.9833	2
					60	796.9839	2
					48	796.9850	2
					65	797.4776	2
					48	797.4777	2
					74	737.4034	2
<hr/>							
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial isoform X2							
Spot 54	78.30/6.36	803240872	763	27	60	967.1607	3
					31	872.4285	2
					38	452.2431	3
					50	554.7909	2
					47	555.2846	2
					117	756.3283	3
					57	756.6571	3
					65	665.3412	2
					81	737.4280	2
					37	737.4286	2
					101	737.4311	2
					81	737.9287	2
					34	648.6617	3
					72	512.2771	2
					78	512.2786	2
					23	531.2860	2
					85	549.9596	2
					35	829.4155	2
					84	829.4209	2
					35	829.9077	2
Spot 55	78.48/6.43	803240872	720	33	24	872.4274	2
					45	452.2419	3
					55	677.8676	2
					48	554.7914	2
					35	554.7922	2
					77	756.3281	3
					52	756.6563	3
					56	665.3430	2
					40	738.3796	3
					40	738.7099	3
					40	786.0710	3
					28	801.3725	3
					95	737.4265	2
					54	737.4286	2

					77	737.9219	2
					33	648.6620	3
					29	595.2869	3
					29	595.6146	3
					24	397.2212	2
					20	531.2860	2
					74	549.9603	3
					34	824.4437	2
					84	829.4190	2
<hr/>							
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial isoform X1							
Spot 56	79.49/6.55	426221069	588	16	85	576.6111	3
					55	576.6112	3
					41	676.8494	2
					48	633.3080	2
					56	633.3088	2
					51	510.2990	2
					55	762.4060	2
					68	716.3183	2
					27	716.8106	2
					84	821.4548	2
					34	615.2832	2
					47	672.8560	2
					66	574.3286	2

¹Valores experimentais foram deduzidos do respectivo mapa 2D pelo software PDQuest.

²Os números sobrescritos entre parênteses referem-se à posição de cada peptídeo dentro da sequência de aminoácidos da proteína completa, de acordo com a busca no banco de dados Mascot.

ANEXO G - TABELA 7. PROTEÍNAS DA MEMBRANA DO ESPERMATOZOIDE DA CAUDA DO EPIDÍDIMO IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS. OS SPOTS NUMERADOS SE REFEREM AOS SPOTS MOSTRADOS NA FIGURA 1.

Protein	Experimental¹ kDa/pI	NCBI nr accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Ion score	m/z	z
A-kinase anchor protein 4							
Spot 1	11.14/4.71	426257009	169	6	32	514.2438	2
					29	514.2454	2
					49	726.8762	2
					43	726.8774	2
					33	432.7404	2
					59	1061.8002	3
ATP synthase subunit delta, mitochondrial							
Spot 2	15.25/4.39	426229491	119	13	86	716.3561	2
					88	716.3606	2
					81	716.8524	2
					31	493.7799	2
Spot 17	43.45/4.39	426229491	121	13	32	716.3600	2
					86	716.3614	2
					80	716.3623	2
					43	716.8547	2
					35	493.7768	2
Sperm acrosome membrane-associated protein 3							
Spot 3	14.40/5.4	426238637	239	26	37	648.8306	2
					67	648.8347	2
					44	648.8348	2
					44	649.3295	2
					39	916.4365	3
					44	916.4386	3
					27	1374.1577	2
					39	916.7664	3
					46	916.7678	3
					24	1374.6500	2
					25	469.2282	2
					26	477.2278	2
					100	872.4211	2
ATP synthase subunit beta, mitochondrial							
Spot 4	13.70/5.62	426224929	92	3	48	544.8233	2
					43	488.2877	2
Spot 11	31.32/5.25	426224929	511	22	28	550.9768	3
					32	639.8232	2
					78	639.8251	2
					54	464.2687	2
					28	519.2699	2
					52	519.8032	2
					44	701.3589	2
					48	544.8239	2
					33	488.2869	2
					44	737.4249	2
					56	809.4110	2
					75	720.4011	2
Spot 20	48.06/5.08	426224929	622	23	30	550.9766	3
					33	639.8248	2
					94	639.8254	2

					53	519.2667	2
					53	519.7835	2
					37	519.8038	2
					67	701.3606	2
					32	544.8237	2
					49	488.2855	2
					49	737.4254	2
					55	809.4114	2
					98	720.4034	2
					95	718.3836	2
					63	718.8770	2
<hr/>							
Sperm acrosome membrane-associated protein 1							
Spot 5	17.48/5.58	426234706	102	15	46	730.8588	2
					27	731.3517	2
					25	638.9767	3
					31	746.3795	2
Spot 8	23.32/4.43	426234706	183	15	60	730.8601	2
					25	731.3520	2
					86	990.9768	2
					37	746.3778	2
Spot 9	24.61/4.4	426234706	92	9	44	730.8592	2
					24	731.3514	2
					48	746.3775	2
<hr/>							
Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial							
Spot 6	17.67/6.0	426244521	146	4	97	877.9827	2
					49	762.4348	2
Spot 16	37.90/4.65	426244521	199	6	103	877.9827	3
					42	442.7656	2
					57	762.4331	2
<hr/>							
Actin-related protein T2							
Spot 7	22.79/5.63	426239824	294	18	36	610.8093	2
					77	899.4495	2
					36	492.7609	2
					27	490.2545	2
					24	611.8099	2
					47	614.7909	2
					49	518.7772	2
Spot 28	37.94/5.26	426239824	156	9	46	492.7598	2
					26	490.2529	2
					38	614.7908	2
					46	518.7774	2
<hr/>							
Acrosome formation-associated factor							
Spot 10	32.39/4.63	426222378	77	2	77	586.2777	2
<hr/>							
Testis-expressed sequence 101 protein							
Spot 12	32.90/5.23	426242984	275	21	21	777.3890	2
					85	777.3890	2
					51	804.9027	2
					62	512.2418	2
					30	399.2148	2
					47	672.8037	2
					42	673.2946	2
Spot 13	33.01/5.46	426242984	224	18	98	777.3886	2
					60	777.8824	2
					41	804.9042	2
					31	512.7351	2
					55	672.8019	2
					29	673.2945	2
					41	673.2945	2
<hr/>							
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial isoform 1							
Spot 14	36.60/5.67	426249335	421	26	59	775.8402	2

					61	917.4688	2
					60	602.8001	2
					68	666.3365	2
					44	622.6500	3
					98	882.4489	2
					32	632.8190	2
<hr/>							
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial							
Spot 15	37.86/5.39	426249303	392	19	90	785.3977	2
					59	610.3198	2
					50	610.3226	2
					31	620.8192	2
					56	620.8196	2
					60	620.8196	2
					35	981.9875	2
					82	620.7857	2
					43	620.7857	2
					70	770.6790	3
Spot 21	41.49/5.50	426249303	405	23	90	785.3969	2
					37	569.2878	2
					29	577.8015	2
					32	578.2918	2
					54	620.8181	2
					50	620.8193	2
					37	579.8181	2
					68	981.9887	2
					32	620.7874	2
					70	770.6784	3
					23	550.700	2
Spot 29	42.50/5.42	426249303	89	5	90	785.3969	2
					54	620.8181	2
<hr/>							
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 32							
Spot 18	43.96/4.81	426256426	241	7	70	957.9240	2
					31	569.7537	2
					24	515.2346	2
					24	515.7346	2
					59	811.9381	2
					45	812.4270	2
					51	628.3221	2
					58	628.3225	2
Spot 19	43.82/4.93	426256426	224	6	81	957.9243	2
					53	958.4146	2
					59	569.2615	2
					30	569.7525	2
					26	515.2359	2
					28	811.9395	2
					59	811.9404	2
					44	812.4315	2
<hr/>							
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial							
Spot 22	42.71/5.82	426236317	496	21	59	532.7689	2
					36	419.7202	2
					77	645.8208	2
					50	646.3129	2
					41	669.8081	2
					59	556.8149	2
					50	620.8638	2
					35	906.9345	2
					39	585.7837	2
					34	709.8605	2
					51	710.3747	2

					44	710.8666	2
					51	487.3014	2
Carboxypeptidase Q							
Spot 23	52.83/5.43	426235810	210	7	65	617.2970	2
					55	450.2885	2
					90	951.4479	2
60kDa heat shock protein, mitochondrial-like							
Spot 24	55.78/5.41	426238538	303	14	70	760.8841	2
					37	695.3598	2
					45	801.8763	2
					60	635.6914	2
					70	636.0199	3
					36	456.7986	3
					44	608.3352	2
Stress-70 protein, mitochondrial							
Spot 25	64.86/5.74	426229624	233	7	50	725.8654	2
					53	621.8474	2
					74	681.3782	2
					56	731.8861	2
Spot 26	64.82/5.81	426229624	281	10	39	725.8640	2
					25	785.4272	2
					84	1028.9825	2
					74	681.3776	2
					39	681.8700	2
					63	796.9849	2
Cytosol aminopeptidase							
Spot 27	52.43/5.98	426231481	85	4	41	596.3198	2
					44	750.3950	2

¹Valores experimentais foram deduzidos do respectivo mapa 2D pelo software PDQuest.

²Os números sobrescritos entre parênteses referem-se à posição de cada peptídeo dentro da sequência de aminoácidos da proteína completa, de acordo com a busca no banco de dados Mascot.