



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**SOLANGE DAMASCENO SOUSA**

**PROTEÔMICA DO FLUIDO DA *RETE TESTIS* DE CARNEIROS MORADA NOVA**

**FORTALEZA-CE**

**2015**

SOLANGE DAMASCENO SOUSA

PROTEÔMICA DO FLUIDO DA *RETE TESTIS* DE CARNEIROS MORADA NOVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução Animal.

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

Coorientador: Dsc. Mauricio Fraga van Tilburg

FORTALEZA-CE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

- D162p Sousa, Solange Damasceno.  
Proteômica do fluido da *rete testis* de carneiros Morada Nova / Solange Damasceno Sousa. –  
2015.  
133 f.: il., color. enc.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,  
Departamento de Zootecnia, Mestrado em Zootecnia, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Produção e Melhoramento Animal.  
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.  
Coorientação: Dr. Maurício Fraga van Tilburg.
1. Ovinos. 2. Espermatogênese. 3. Proteoma. I. Título.

---

CDD 636.08

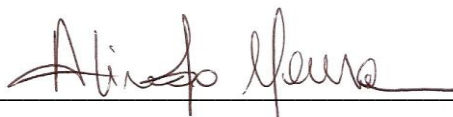
SOLANGE DAMASCENO SOUSA

PROTEÔMICA DO FLUIDO DA *RETE TESTIS* DE CARNEIROS MORADA NOVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução Animal.

Aprovada em: 09/02/2015.

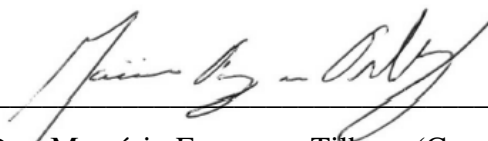
BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



---

Dsc. Maurício Fraga van Tilburg (Coorientador)

Universidade Estadual do Ceará (UECE)



---

Dsc. Paula Rodriguez Villamil

Universidade Federal do Ceará (UFC)



---

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

As minhas duas mães Maria Mendes de Sousa e Maria Socorro de Sousa (tia) que são as principais responsáveis por essa conquista.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

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

A toda minha família, especialmente aos meus pais Enoch Sousa e Maria Mendes e a minha irmã Patrícia Rufino os quais me deram apoio emocional e estrutural fundamentais para essa importante etapa da minha vida.

A minha tia Socorro Mendes, essa grande mulher, que é essencial na minha vida. Obrigada pelos conselhos, pela paciência, força, apoio, incentivo, entusiasmo, comprometimento, por acreditar e torcer por mim, enfim por me proporcionar todas as condições para obtenção dessa conquista.

Ao Prof. Arlindo Moura, pela oportunidade de cursar o mestrado, orientação e conhecimentos transmitidos.

Ao meu coorientador Mauricio Fraga van Tilburg, pelos conhecimentos, pela paciência, ajuda e empenho para realização desse trabalho.

A toda equipe do laboratório de Fisiologia Animal, em especial aos meus grandes amigos no decorrer dessa trajetória: Ana Luiza, Fágner, Taciane, Révila e Aderson. Obrigada pela amizade, paciência, conselhos e apoio.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela concessão da bolsa.

## RESUMO

O objetivo do estudo foi identificar e caracterizar as proteínas do fluido da *rete testis* de carneiros Morada Nova. Os testículos, obtidos de seis carneiros Morada Nova abatidos, foram imediatamente dissecados. A cabeça do epidídimo foi separada para ter acesso aos ductos eferentes. O fluido oriundo dos ductos eferentes foi obtido por massagem do testículo. Posteriormente, o fluido foi centrifugado para remoção dos debris celulares e espermatozoides. As proteínas foram precipitadas com acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  e quantificadas pelo método de Bradford. Cada amostra (400  $\mu\text{g}$ ) foi focalizada em tiras de 13 cm (pH 4-7) e a segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE a 15%. Os géis obtidos foram escaneados com um ImageScanner II (GE Lifesciences, EUA) e analisados utilizando o aplicativo PDQuest<sup>®</sup> versão 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, EUA). Os *spots* detectados após a análise dos mapas 2-D no PDQuest foram cortados dos géis e submetidos a digestão com tripsina. As proteínas foram identificadas por espectrometria de massa em tandem. A informação sobre a proteína adquirida pela busca no MASCOT foi analisada através da utilização do programa para anotações de proteínas (STRAP). Redes de interação proteína-proteína foram obtidas a partir do banco de dados STRING versão 9.0. Nos géis foram detectados em média  $227 \pm 32,1$  *spots*, onde 51% das proteínas se encontraram acima de 40 kDa representando 65% da intensidade de todos os *spots* detectados nos géis. Com base na análise da ontologia gênica, os processos biológicos mais comuns associados às proteínas do fluido rete testis foram regulação (24,28%) e processos celulares (23,27%). Ligação (27,42%) e a atividade catalítica (19,30%) corresponderam às funções moleculares mais frequentes. As proteínas mais intensamente expressas foram: albumina, clusterina, serotransferrina, imunoglobulina gama-1 e alfa-2-HS-glicoproteína. A maioria das proteínas identificadas desempenha importantes papéis nos processos de espermatogênese, proteção espermática, motilidade, capacitação e reação acrossômica. O fluido da *rete testis* possui várias proteínas envolvidas na espermatogênese, o que representa um importante fator, uma vez que estas moléculas contribuem para o desenvolvimento das células germinativas, participando no transporte e conversão de substâncias requeridas para a produção dos gametas masculinos.

**Palavras-chave:** *Rete testis*. Proteoma. Fluido. Ovino. Espermatogênese.

## ABSTRACT

The aim of the study was to identify and characterize the proteins of the rete testis fluid from Morada Nova rams. The testicles, obtained from six slaughtered Morada Nova rams, were immediately dissected. The head of the epididymis was separated to gain access to the efferent ducts. The fluid from the efferent ducts was obtained by testis massage. Thereafter, the fluid was centrifuged to remove cell debris and sperm. Proteins were precipitated with acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$  and quantified by the Bradford assay. Each sample (400  $\mu\text{g}$ ) was focused in strips of 13 cm (pH 4-7) and the second dimension was conducted on SDS-PAGE 15%. The gels were scanned with an ImageScanner II (GE Lifesciences, USA) and analyzed using the PDQuest<sup>®</sup> version 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, USA). Spots detected after PDQuest analysis of 2-D maps were cut from gels and submitted to trypsin digestion. Proteins were identified using tandem mass spectrometry. Protein information obtained by MASCOT was analyzed using the software tool for searching annotations of proteins (STRAP). Protein-protein interaction networks were obtained from STRING version 9.0 database. In the gels were detected  $227 \pm 32.1$  spots (mean  $\pm$  SD), where 51% of the proteins were found above 40 kDa, corresponding to 65% of the intensity of all spots detected. Based on gene ontology analysis, the most common biological processes associated with proteins from rete testis fluid were regulation (24.28%) and cellular process (23.27%). Binding (27.42%) and catalytic activity (19.30%) corresponded to the most frequent molecular functions for those proteins. The most intensely expressed proteins were: albumin, clusterin, serotransferrin, immunoglobulin gamma-1 chain and alpha-2-HS-glycoprotein. The *rete testis* fluid has a large quantity of proteins related to the spermatogenesis. This feature is important in view of the fact that these molecules contribute to the development of the germ cells, as a result of the transport and conversion of substances required to the production of male gametes.

**Keywords:** Rete testis. Proteome. Fluid. Ovine. Spermatogenesis.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Divisão da <i>rete testis</i> por regiões .....	17
Figura 2 – Modelo esquemático dos principais componentes do plasma seminal e suas funções sobre os espermatozoides .....	20
Figura 3 – Dissecção do testículo e coleta do fluido da <i>rete testis</i> .....	33
Figura 4 – Gel bidimensional das proteínas do fluido da <i>rete testis</i> de carneiros Morada Nova.....	38
Figura 5 – Gráficos das anotações da ontologia gênica das proteínas do fluido da <i>rete testis</i> de carneiros Morada Nova com base nos seus componentes celulares, processos biológicos, funções moleculares .....	40
Figura 6 – Análise <i>in silico</i> das interações da albumina (ALB) .....	42
Figura 7 – Análise <i>in silico</i> das interações da clusterina (CLU) .....	42
Figura 8 – Análise <i>in silico</i> das interações da sertotransferrina (TF) .....	43
Figura 9 – Análise <i>in silico</i> das interações da imunoglobulina gama 1 (IGHG1) .....	43
Figura 10 – Análise <i>in silico</i> das interações da alfa-2-HS-glicoproteína (AHSG) .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas do fluido da <i>rete testis</i> de carneiros da raça Morada Nova identificadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) associada à espectrometria de massa (ESI-Q-Tof).....	87
Tabela 2. Percentual da intensidade das proteínas identificadas no fluido da <i>rete testis</i> de ovinos Morada Nova .....	39
Tabela 3. Classificação das proteínas identificadas no fluido da <i>rete testis</i> com base na sua função .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{l}$  – microlitro

ALP – fosfatase alcalina

aSFP – proteína ácida do fluido seminal bovino

AST – aspartato amino transferase

BSP – proteína ligante do espermatozoide

BSA – albumina sérica bovina

CAT – catalase

CID – dissociação induzida por colisão

cm – centímetro

FRT – fluido da rete testis

g – grama

g – gravidade

GOT – oxaloacético glutâmico transaminase

GPx/GRD – glutathiona peroxidase/reductase

HBP – proteína ligadora de heparina

HDL – lipoproteína de alta densidade

kDa – kiloDalton

LDH – lactato desidrogenase

M – molar

mA – miliAmpere

ml – mililitro

mM – milimolar

OPN – osteopontina

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PGDS – prostaglandina D sintetase

pH – potencial hidrogeniônico

PLA2 – fosfolipase A2

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil-sulfato de sódio

SOD – superóxido dismutase

V – volt

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Espermatogênese: secreções e fluidos .....	14
2.2 <i>Rete testis</i> .....	15
2.2.1 Anatomia da <i>rete testis</i> .....	16
2.2.2 Fluido da <i>rete testis</i> .....	17
2.3 Plasma seminal .....	19
2.4 Proteínas associadas à fertilidade .....	23
2.5 Proteômica .....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 Animais e coleta .....	32
3.2 Quantificação da concentração da proteína total no fluido da <i>rete testis</i> .....	32
3.3 Eletroforese bidimensional .....	34
3.4 Digitalização e análise dos géis .....	35
3.5 Digestão das proteínas .....	35
3.6 Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-Q-Tof ( <i>Electrospray ionization quadrupole-time-of-flight</i> ) .....	35
3.7 Pesquisa em banco de dados e classificação das proteínas .....	36
3.8 Análise das redes de interação das proteínas .....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	38
4.1 Eletroforese 2D e identificação das proteínas por espectrometria de massa ESI-Q-Tof ( <i>Electrospray ionization quadrupole-time-of-flight</i> ) .....	38
4.2 Análise da ontologia gênica .....	40
4.3 Análise das redes de interação das proteínas .....	41
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	45
5.1 Proteínas associadas à espermatogênese .....	47
5.2 Proteínas associadas à proteção espermática .....	49
5.3 Proteínas associadas à motilidade espermática .....	53
5.4 Proteínas associadas à capacitação espermática .....	54
5.5 Proteases e inibidores .....	55
5.6 Enzimas glicolíticas .....	58
5.7 Outras proteínas identificadas no fluido da <i>rete testis</i> .....	59

<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A motilidade e a morfologia espermática têm sido as características seminais mais empregadas para avaliação do potencial reprodutivo do macho (GODFREY et al., 1990; CORREA et al., 1997). Contudo, estes parâmetros possuem uma restrita capacidade na avaliação do potencial reprodutivo do animal (KJAESTAD et al., 1993; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1998). O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozoides os quais representam menos que 1% do volume total e o plasma seminal (WITE, 1988). O plasma seminal consiste de um fluido produzido pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (KARESKOSKI; KATILA, 2008). Ele atua como um mediador essencial para as funções dos espermatozoides *in vivo*, desde a ejaculação até a fertilização.

As proteínas constituem o componente mais abundante do plasma seminal e influenciam o metabolismo espermático, além de desempenharem funções distintas em diferentes estágios do processo de fertilização (PILCH; MANN, 2006; SHIVAJI et al., 1990). Consequentemente, a identificação desses componentes presentes no plasma seminal constitui um método que poderá avaliar a capacidade fecundante dos animais. A composição proteica do plasma seminal de diversas espécies domésticas vem sendo mapeada, por meio da técnica de eletroforese, na busca de marcadores biomoleculares associados à fertilidade (RONCOLETTA et al., 1999; CARDOZO et al. 2006). As técnicas de proteômica objetivam isolar e identificar as proteínas, estudar suas propriedades, níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações proteicas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK; WEIR, 1999). A análise proteômica dos fluidos do trato reprodutivo proporciona informações relevantes para o entendimento dos mecanismos que determinam a habilidade fecundante dos gametas masculinos, uma vez que a função espermática, posterior à espermatogênese, é modulada significativamente por modificações pós-traducionais de proteínas celulares (MOURA et al., 2011).

Durante o processo de espermatogênese, os espermatozoides ainda imaturos são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos, na presença de fluidos testiculares. Os espermatozoides e fluidos são posteriormente transportados para a *rete testis* via túbulos retos e, consequentemente, para a cabeça do epidídimo via ductos eferentes. A *rete testis* consiste de uma série de canais interligados revestidos por uma única camada de células epiteliais

cuboides com microvilosidades superficiais e um único cílio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O fluido da *rete testis* (FRT) foi coletado *in vivo* pela primeira vez em carneiros (VOGLMAYR; SETCHELL, 1966) e, em seguida, em touros (VOGLMAYR; WHITE, 1970) por canulação, método que consiste na inserção de um cateter através dos ductos eferentes para a *rete testis*. Este fluido é constituído pelas secreções dos túbulos seminíferos e do epitélio da *rete testis* (SETCHELL, 1975) e seus componentes fornecem o ambiente bioquímico no qual os espermatozoides serão mantidos antes de serem transportados para o epidídimo. O FRT possui uma estreita relação com o desenvolvimento dos espermatozoides. A determinação da sua composição proteica poderá contribuir para uma melhor compreensão da regulação, crescimento e desenvolvimento dos espermatozoides. Pouco se sabe sobre o perfil proteico desse fluido, uma vez que poucas proteínas têm sido identificadas e caracterizadas. Em vista disso, o presente estudo objetiva identificar e caracterizar as proteínas do fluido da *rete testis* de carneiros da raça Morada Nova.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espermatogênese: secreções e fluidos

O testículo é dividido em três compartimentos: o intersticial que é externo aos túbulos seminíferos, o compartimento basal e o adluminal que são internos aos túbulos. Estes dois últimos compartimentos são separados por uma complexa junção entre as células de Sertoli, a barreira hematotesticular a qual protege a espermatogênese de macromoléculas oriundas do sangue, dessa forma impedindo uma resposta autoimune contra as células germinativas diferenciadas (FRANÇA; RUSSELL, 1998). O compartimento basal do túbulo seminífero contém as células de Sertoli, as espermatogônias e os espermatócitos primários, enquanto o compartimento adluminal é constituído por espermátides e espermatócitos secundários. O espaço intersticial do parênquima testicular é composto de células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, e outras populações de células, como macrófagos e mastócitos, além de tecido conjuntivo (STABENFELOT; EDQVIST, 1996).

As espermatogônias quiescentes nos túbulos seminíferos começam a se multiplicar na puberdade. Por divisão mitótica as espermatogônias dão origem aos espermatócitos os quais se diferenciam em espermátides por divisão meiótica. As espermátides sofrem uma série de modificações progressivas estruturais originando os espermatozoides. Quando o desenvolvimento das células germinativas é completado, as espermátides maduras são liberadas já como espermatozoides no lúmen dos túbulos, e avançam através da *rete testis* via túbulos retos, até entrarem no epidídimo via ductos eferentes. Durante o trânsito epididimário, os espermatozoides sofrem uma série de modificações bioquímicas para se tornarem espermatozoides móveis capazes de fertilizar (O'DONNELL et al., 2001). As secreções da *rete testis*, os cílios dos ductos eferentes e os elementos contráteis dos testículos auxiliam o trânsito epididimário (HARGROVE et al., 1977). O fluido testicular é constituído pelas secreções das células de Sertoli e células epiteliais da *rete testis*. Contudo, as células de Sertoli são a fonte predominante da secreção de fluido que deixa os testículos, empurrando solutos para dentro do compartimento adluminal, formando um gradiente osmótico, constituído por várias proteínas (HANSSON et al., 1976), associado aos andrógenos, sintetizados pelas células de Leydig, os quais contribuem no trânsito dentro da cabeça do epidídimo.



O fornecimento de um microambiente indispensável para a espermatogênese é uma das funções mais importantes das células de Sertoli (GRISWOLD, 1998). As células germinativas em desenvolvimento estão embebidas pelos fluidos e proteínas secretados por estas células. Esses fluidos também conduzem os espermatozoides através dos túbulos em direção à *rete testis*. As células de Sertoli são sensíveis ao FSH e à testosterona e secretam a proteína transportadora de andrógenos (ABP). A principal função da ABP é o transporte extracelular de testosterona, para manter elevadas concentrações desse hormônio nos túbulos seminíferos, uma vez que a concentração sanguínea de testosterona não é suficiente para manter sua função nessa local (GRISWOLD, 1998). A transferrina e a ceruloplasmina são proteínas transportadoras de ferro e cobre, respectivamente, e são secretadas pelas células de Sertoli para o meio intratubular. Esses minerais são necessários para a maturação das células germinativas. A produção dessas proteínas é influenciada por FSH, testosterona e retinol (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004). As células de Sertoli também secretam ativadores de plasminogênio, enzimas envolvidas na migração celular, facilitando a liberação das espermátides maduras e a migração das células germinativas do compartimento basal para o adluminal. Além disso, o ativador de plasminogênio pode estar envolvido na reabsorção de corpos residuais (AMANN, 1993; HULEIHEL; LUNENFELD, 2004). Outras substâncias produzidas pelas células de Sertoli são: o lactato que serve como fonte de energia para as células germinativas e o IGF-1 que parece se ligar ao espermátócito estimulando sua diferenciação (DADOUNE; DEMOULIN, 1993). As células de Leydig também atuam na espermatogênese através da produção da testosterona. A testosterona produzida por essas células desloca-se para dentro do túbulo seminífero por difusão simples ou facilitada. Elevadas concentrações são indispensáveis para a espermatogênese e principalmente para o processo de meiose. A ação dos andrógenos na espermatogênese acontece via células de Sertoli, já que as células germinativas não possuem receptores para andrógenos (LYU; HANDELSMAN, 2003). As secreções dos túbulos seminíferos juntamente com as células espermáticas serão, em seguida, transportadas para a *rete testis*.

## **2.2 Rete testis**

A estrutura da *rete testis* foi analisada em vários primatas, animais domésticos e roedores e muitas características morfológicas e ultraestruturais já foram descritas (BUSTOS-OBREGÓN; HOLSTEIN, 1976; DYM, 1976). A *rete testis* consiste de uma série de canais

amplamente interconectados os quais ligam os túbulos seminíferos aos ductos eferentes. É revestida por células epiteliais cubóides ciliadas que também contêm microvilosidades. A atividade ciliar ajuda a mover os espermatozoides ao longo do tubo, à medida que são imóveis até atingirem epidídimo. As microvilosidades absorvem o excesso de materiais, incluindo proteínas e potássio, a partir do fluido seminal. Além disso, a *rete testis* secreta quantidades substanciais de fluido (KORMANO, 1977).

### 2.2.1 Anatomia da *rete testis*

A *rete testis* está situada no mediastino do testículo, paralela ao eixo do epidídimo circundada por tecido conjuntivo denso altamente vascularizado. Na maioria das espécies de mamíferos consiste de uma série de canais anastomosados através dos quais percorrem o fluido e os espermatozoides dos túbulos seminíferos antes de entrar nos ductos eferentes. Os canais são revestidos por uma única camada simples de células epiteliais cubóides contendo microvilosidades na superfície luminal (SETCHELL, 1970; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As células epiteliais da *rete testis* possuem um núcleo grande em relação ao citoplasma, moderadamente recuado com estrutura esférica e caracteriza-se por aglomerados proeminentes de heterocromatina ao longo do invólucro nuclear. As mitocôndrias apresentam-se curtas em forma de bastonete ou esféricas (TUNG et al., 1987). Microvesículas, algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres estão presentes. São raramente observados retículo endoplasmático liso, grânulos de secreção, lisossomos ou outros tipos de corpos densos. A superfície apical das células exibe numerosas microvilosidades e um único flagelo muito longo o qual se presume ser móvel. Ao longo das superfícies das células laterais são encontrados complexos juncionais firmes e desmossomos (DYM, 1976).

Roosen-Runge e Holstein (1978) dividiram a *rete testis* em três regiões (Fig. 2): (a) *rete septal* ou intratesticular parte representada pelos túbulos retos; (b) *rete mediastinal* ou intratunical parte que é uma verdadeira rede de canais incorporados na túnica albugínea que se expande em torno da rede no mediastino testicular e (c) *rete extratesticular* caracterizada por dilatações (até 3mm de largura).

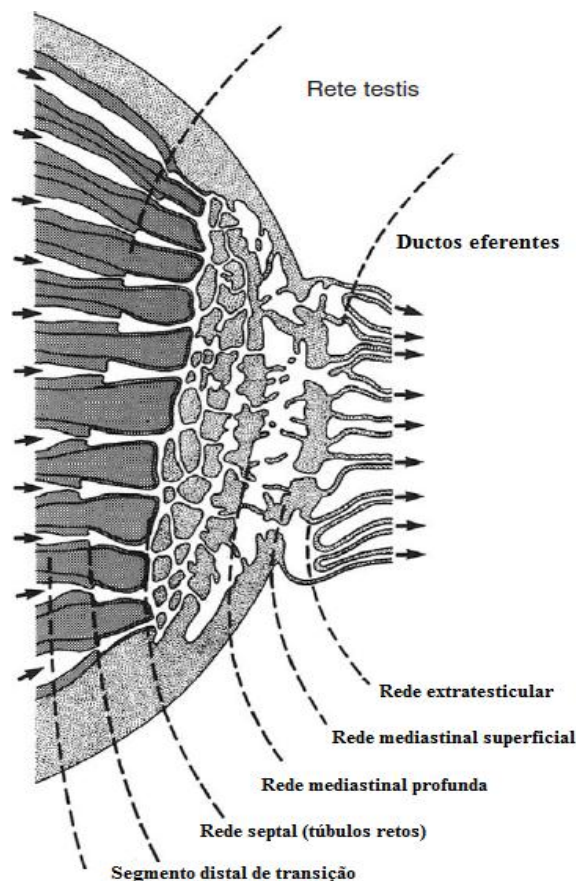


Figura 1. Divisão da *rete testis* por regiões. Adaptado por Kerr (1987).

A *rete* mediastinal caracteriza-se por uma rede irregular de filamentos cilíndricos que variam de diâmetro 5 a 40  $\mu\text{m}$ . Os filamentos mais finos são avasculares, todavia cada um possui uma matriz fibroelástica contendo elementos celulares miofibroblásticos, como as células mióides que demonstram características semelhantes àquelas que envolvem os túbulos seminíferos. A *rete* extratesticular é caracterizada por dilatações vesiculares visíveis macroscopicamente, as quais atuam como portais para o sistema de ducto excurrente, que se estende como os ductos eferentes (ROOSEN-RUNGE; HOLSTEIN, 1978).

### 2.2.2 Fluido da *rete testis*

A *rete testis* de mamíferos contribui com cerca de 65% do fluido total que entra nos ductos eferentes do testículo, e a composição do fluido dos túbulos seminíferos difere daquele da *rete testis* (WAITES, 1977). Ela desempenha um importante papel na secreção de fluidos no qual os espermatozoides são suspensos e transportados para o epidídimo. Além disso, estudos anteriores indicaram que a composição do fluido secretado pelos túbulos

seminíferos é significativamente alterada na *rete testis*, sugerindo que essa estrutura pode ter várias outras funções além de servir apenas como um canal intercalado (KORMANO, 1977; MORALES et al., 1984.).

O fluido da *rete testis* (FRT) é composto pelas secreções dos túbulos seminíferos e epitélio da *rete testis* (SETCHELL, 1975). O fluido deixa a *rete testis* continuamente a uma taxa constante e normalmente contém entre 0,3 e  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml. O fluido é isosmótico com o plasma sanguíneo apresentando quantidades inferiores de bicarbonato, sódio, cálcio, fósforo e magnésio; e quantidades superiores de potássio, cloreto e ácido glutâmico (VOGLMAYR et al., 1970). Aminoácidos como glicina, prolina, lisina, alanina, aspartato, histidina, arginina, leucina, treonina, serina, valina e isoleucina foram relatados na composição do FRT, sendo que a maior parte está presente em baixa concentração em relação à linfa testicular ou plasma sanguíneo. Segundo Sexton (1971), o glutamato é o principal aminoácido livre no líquido da rete testis de bovinos.

Setchel (1970) relata que a maioria das enzimas normalmente encontradas no plasma sanguíneo também é encontrada no fluido testicular, mas em concentrações mais baixas, devido à baixa concentração de proteínas. No entanto, enzimas como N-acetil-beta-glucosaminidase, fosfatase ácida, arilsulfatase, e hialuronidase estão presentes numa concentração mais elevada em comparação com o plasma sanguíneo (HARTREE; SRIVASTAVA, 1965; DOTT; DINGLE, 1968).

Outro composto nitrogenado encontrado no FRT é a ureia a qual possui concentrações semelhantes às do plasma sanguíneo ou linfa testicular (SETCHELL et al., 1969). Há cerca de metade do lactato no fluido da *rete testis* bem como no plasma sanguíneo e, normalmente, não há praticamente nenhuma glicose ou frutose (VOGLMAYR et al., 1966). Também é encontrada uma alta concentração de inositol, no entanto não está claro por que deveria haver essa elevada concentração.

A testosterona pode ser encontrada em concentrações comparáveis com aquelas na linfa testicular e ligeiramente menor em relação ao plasma sanguíneo (VOGLYMAR et al., 1966). Ressalta-se que seus níveis no FRT variam de acordo com a espécie (COOPER; WAITES, 1975). Exames mais detalhados são necessários sobre a identidade dos esteroides presentes no fluido da *rete testis* e as suas concentrações em várias condições (KORMANO, 1977). O FRT também contribui para a composição do plasma seminal.

### 2.3 Plasma seminal

O sêmen consiste de espermatozoides suspensos em um meio fluido chamado plasma seminal o qual atua como mediador das funções bioquímicas do ejaculado. O plasma seminal é normalmente um líquido isotônico e seu pH varia de acordo com a espécie sendo levemente ácido em carneiros. Seus componentes bioquímicos são secretados a partir da *rete testis*, epidídimo, ducto deferente e glândulas sexuais acessórias do trato reprodutivo masculino sendo expelidos em frações durante a ejaculação por meio das contrações uretrais (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). As glândulas sexuais acessórias (vesícula seminal, próstata, e a glândula Bulbouretral) contribuem com a maior parte do volume do ejaculado, e a secreção da vesícula seminal constitui a maior parte do plasma seminal (na maioria dos ruminantes) na ejaculação (METAFORA et al., 1989). Os espermatozoides compõem menos que 1% do volume total (WITE, 1988).

A contribuição das glândulas acessórias varia largamente não somente entre espécies, mas também entre indivíduos da mesma espécie e, dependendo da ocasião, entre ejaculados do mesmo indivíduo (KING, 1993). Outros fatores como: idade, condições climáticas, estado nutricional e a frequência da ejaculação afetam, notoriamente, a quantidade e a qualidade do sêmen (EVANS; MAXWELL, 1990). Por muitos anos, o plasma seminal foi considerado apenas como um meio de sobrevivência que facilita o transporte espermático. No entanto, observou-se que a utilização de sêmen para inseminação artificial que geralmente envolve extensa diluição ou remoção do plasma seminal, resulta em taxas de fertilidade mais baixas em comparação com o acasalamento natural (TUMMARUCK et al., 2000). Além disso, estudos adicionando plasma seminal de machos de alta fertilidade às células espermáticas de machos de baixa fertilidade têm provado a importância deste fluido na fertilidade *in vivo* (AURICH et al., 1996; RODRIGUES et. al., 1999). Essas evidências sugerem que os componentes do plasma seminal participam de eventos importantes relacionados à função do espermatozoide.

O plasma seminal desempenha diversas funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação como: ativação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, neutralização dos metabólitos espermáticos, sobrevivência dos espermatozoides no trato genital da fêmea por ser um meio tamponado e rico em nutrientes, dentre outros; além disso, influencia no equilíbrio osmótico (POLASKI; KOPTA, 1982; EVANS; MAXWELL, 1990).

Sua composição contém íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), cloreto, carboidratos, ácido cítrico, lipídios, aminoácidos, peptídeos, hormônios e proteínas de baixo e alto peso molecular que constituem o componente orgânico mais abundante (PILCH; MANN, 2006). Componentes nitrogenados como amônia, ureia, ácido úrico e creatinina e substâncias redutoras como o ácido ascórbico também estão presentes no plasma seminal de ruminantes (MANN, 1964). Esses constituintes bioquímicos modulam uma variedade de funções espermáticas (CALVETE et al., 1994) e alguns são relativamente específicos dentro do mecanismo de regulação da função do espermatozoide (STREZEZEK et al., 1992; Figura 1).

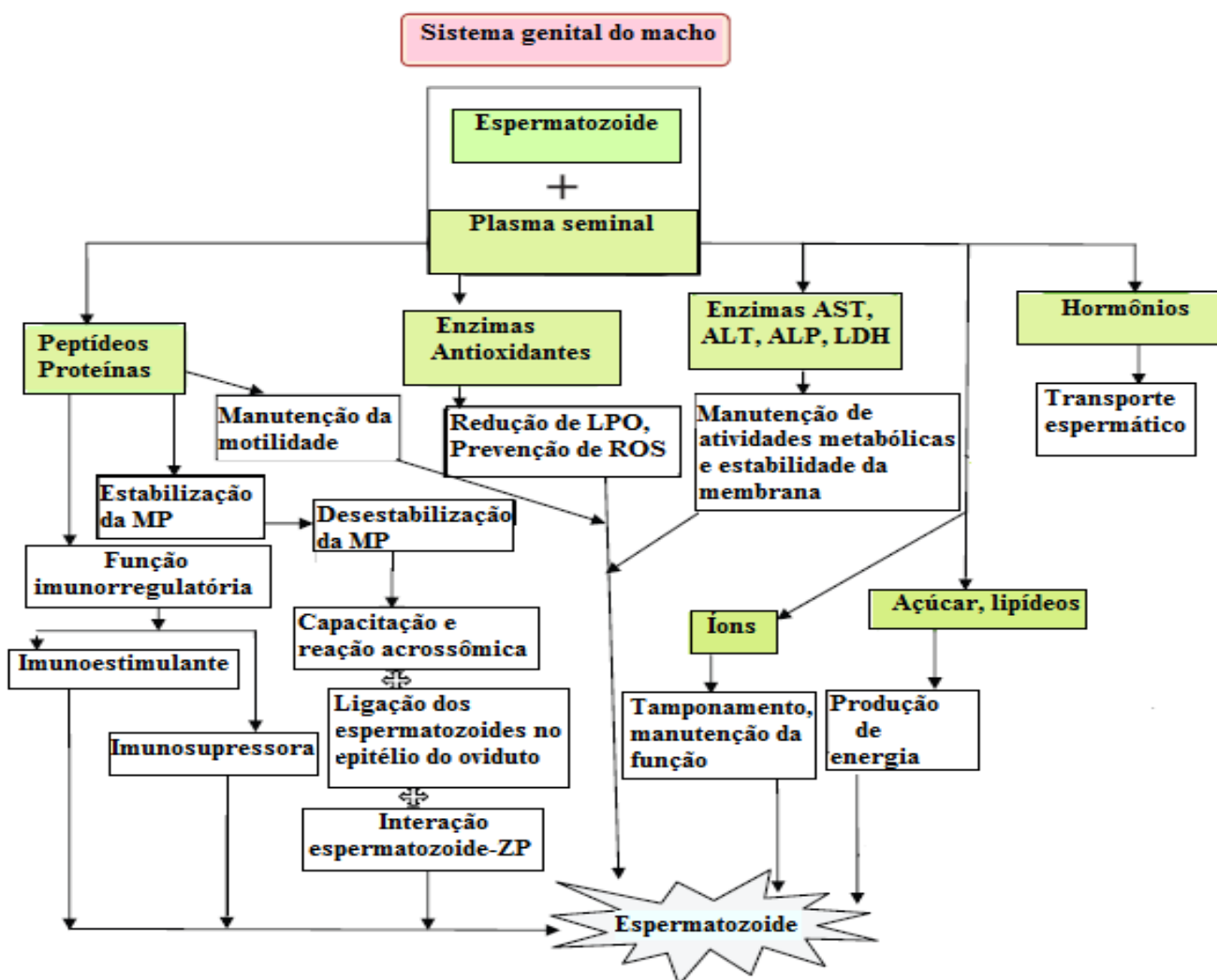


Figura 2. Modelo esquemático dos principais componentes do plasma seminal e suas funções sobre os espermatozoides. MP (membrana plasmática); AST (aspartato aminotransferase); ALT (alanina aminotransferase); ALP (fosfatase alcalina); LDH (desidrogenase láctica); LPO (peroxidação lipídica); ROS (espécies reativas de oxigênio); ZP (zona pelúcida). Adaptado de Nasrin (2012).

A função espermática é bastante dependente do ambiente iônico (HAMAMAH; GATTI, 1998). Os principais íons do plasma seminal são: Na, K, Ca e Mg os quais exercem o equilíbrio osmótico e são componentes importantes de várias enzimas (CEVIK et al., 2007). Alguns relatos sugerem que o potássio está correlacionado com a viabilidade dos espermatozoides (HAFEZ; HAFEZ, 2000). Esse íon é um inibidor metabólico natural e sua elevada concentração no plasma seminal reduz o metabolismo espermático ocasionando diminuição da motilidade do espermatozoide (MASSÁNYI et al., 2003).

O cálcio é um importante regulador da fisiologia espermática. Atua como desencadeador da reação acrossômica, além de estar envolvido em várias etapas da maturação e capacitação (WONG, 2001). O magnésio desempenha um papel fundamental como cofator em várias reações enzimáticas que envolvem o metabolismo energético e a síntese de ácidos nucleicos (WONG et al., 2001). O zinco desempenha um papel importante na motilidade espermática, exercendo atividade protetora antioxidante sua principal origem no plasma seminal é a próstata. É considerado também como fator antimicrobiano para bactérias gram-negativas e positivas (BARRIER-BATTUT et al., 2002). O cobre é imprescindível para a funcionalidade de determinadas enzimas. A enzima Cu-Zn superóxido dismutase envolvida na proteção dos espermatozoides contra radicais livres, e a enzima citocromo oxidase a qual é responsável pelo fornecimento de energia e pela imunidade celular e humoral, dependem do íon cobre. Os níveis de cloreto no sêmen influenciam o potencial de membrana do espermatozoide e a motilidade em associação com cátions (DHAMI; SAHNI, 1993).

A frutose é um importante componente do plasma seminal de ruminantes, sendo sintetizada a partir da glicose sanguínea pelas glândulas acessórias, principalmente nas vesículas seminais, que são estimuladas pela testosterona (MANN; LUTWAK-MANN, 1948; KUMAR; FAROOQ, 1994), esse componente é a principal fonte de energia utilizada pelos espermatozoides (SANCHEZ-PARTIDA et al., 1999). O sorbitol é um açúcar redutor presente no plasma seminal de ruminantes. A enzima sorbitol-desidrogenase é encontrada nos espermatozoides de carneiros, ela permite a conversão de sorbitol em frutose e é utilizada como um substrato metabólico (SETCHELL; BROOKS, 1988). Os açúcares que compõem o plasma seminal têm sido correlacionados com a fertilidade, especialmente pela importância na produção de energia para o espermatozoide (GARNER et al., 2001). Outro componente principal do fluido seminal é o ácido cítrico o qual atua como um agente regulador necessário

em muitos sistemas bioquímicos, portanto possuindo uma importância relevante para o metabolismo e motilidade espermática (POLAKOSKI; KOPTA, 1982).

Grande parte das enzimas encontradas no plasma seminal atua como agente antioxidante, prevenindo a peroxidação dos lipídeos de membrana pelas espécies reativas ao oxigênio e, conseqüentemente, fragmentação do DNA espermático (LEWIS, 1997). A catalase (CAT), o superóxido dismutase (SOD) e o sistema glutatona peroxidase/reductase (GPx/GRD) são as principais enzimas com ação antioxidante encontradas no sêmen (ALMEIDA, 2006). Outras enzimas estudadas incluem aspartato amino transferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), lactato desidrogenase (LDH), alanina aminotransferase, e oxaloacético glutâmico transaminase (GOT), as quais são utilizadas como bons indicadores da qualidade do sêmen, porque eles medem a estabilidade da membrana espermática (SIRAT et al, 1996).

Muitas das proteínas do plasma seminal são produtos das secreções do epidídimo e vesículas seminais (CHANDONNET et al., 1990). Elas estão envolvidas na motilidade e metabolismo espermático, na supressão da resposta imune feminina contra antígenos espermáticos, no equilíbrio osmótico e, ainda, exercem diferentes funções nos distintos estágios do processo de fertilização (SHIVAJI et al., 1990). Além disso, estudos realizados por Barrios et al. (2000) mostraram uma correlação positiva entre o teor de proteína total no plasma seminal e a capacidade de congelar o sêmen de carneiros. As proteínas que compõem o plasma seminal foram classificadas em três grupos: proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISPs), proteínas que possuem o domínio fibronectina tipo II (Fn-2) e as espermadesinas (KARESKOSKO, 2008). O papel dos membros da família das CRISPs parece estar envolvido com processos da espermiogênese, maturação e capacitação do espermatozoide, e na interação espermatozoide-oócito (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

As proteínas do grupo Fn-2 durante a ejaculação se ligam aos espermatozoides mediante interações específicas com os resíduos de colina dos fosfolipídios da membrana do espermatozoide (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; MÜLLER et al., 1998), mediando a capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolipídios (THÉRIEN et al., 1999). Essas proteínas também exibem a habilidade de se ligarem à heparina no trato genital da fêmea (MANJUNATH et al., 1993). A heparina é um glicosaminoglicano que se une ao espermatozoide podendo induzir o processo de capacitação (LENZ et al., 1983; MILLER et



al., 1990). Nos carneiros esse grupo é representado pelas RSVP-14, RSVP-20, RSP-15, RSP-22 e RSP-24 (BARRIOS et al., 2005; BERGERON et al., 2005). As RSVPs desempenham a função de proteção dos espermatozoides, prevenindo (PÉREZ-PÉ et al., 2001) e reparando (BARRIOS et al., 2000) os danos causados à membrana espermática durante a criopreservação. As espermadinas têm capacidade de se ligar a carboidratos; podem atuar como inibidores de proteinases e fosfolípídeos; influenciam várias funções reprodutivas como a capacitação espermática, a estabilização do acrossoma e a fusão espermatozoide-oócito durante o processo de fertilização (TÖPFER-PETERSEN et al., 1998). Em ovinos são encontradas as espermadinas de 15,5kDa (BERGERON et al., 2005) e as Bdh-1 e Bdh-2 (SOUZA et al., 2012). Devido à variedade de funções exercidas pelas proteínas sobre os processos espermáticos, estas moléculas têm sido associadas positivamente ou negativamente com a fertilidade dos machos.

## **2.4 Proteínas do plasma seminal associadas à fertilidade**

A perspectiva de dispor de marcadores que auxiliem na indicação do potencial reprodutivo animal tem sido alvo de várias pesquisas nas últimas décadas, o que provavelmente poderá contribuir expressivamente na seleção de reprodutores superiores. Grande parte dos procedimentos atuais de análise do sêmen não assegura totalmente a predição da fertilidade potencial dos reprodutores, possivelmente porque eles não consideram importantes etapas no processo de fertilização, tais como a capacitação espermática e a reação acrossômica (AMMAN; HAMMERSTEDT, 1993). Análises bioquímicas agregadas aos critérios de avaliação dos espermatozoides poderiam auxiliar na detecção de diferenças relevantes entre a fertilidade dos animais. Nesse contexto, pesquisas demonstram a existência de associações significativas entre a expressão de proteínas seminais e a fertilidade dos machos avaliada *in vivo* e *in vitro*. Essas proteínas podem ser consideradas marcadores moleculares da fertilidade (KILLIAN et al., 1993; MOURA et al., 2006a).

O plasma seminal tem sido objeto de várias pesquisas, em vista da descoberta de sua importância na viabilidade espermática. Relatos em várias espécies sugerem que as proteínas secretadas no plasma seminal exercem um papel importante durante os processos de capacitação e fertilização espermáticas (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1998). Miller et al. (1990), avaliando o sêmen de bovinos, observaram que a presença do plasma seminal é

imprescindível para a capacitação espermática e posterior fecundação, devido à presença de determinadas proteínas denominadas HPBs (*heparin binding proteins*). A heparina é secretada na fase folicular pelo trato reprodutor da fêmea e se liga ao espermatozoide bovino por meio das HBPs, sendo capaz de induzir o processo de capacitação espermática (LENZ et al., 1983; MILLER et al., 1990).

As HBPs são produzidas pelas glândulas sexuais acessórias (próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais) (NASS et al., 1990) e secretadas no plasma seminal, elas possuem a capacidade de se ligar à membrana plasmática do espermatozoide no momento em que eles entram em contato com o plasma seminal, assim os espermatozoides adquirem receptores específicos, através dos quais tornam-se responsivos ao efeito da capacitação pela heparina. Uma maior afinidade de ligação à heparina está relacionada a maiores taxas de reação acrossômica (AX et al., 1985; AX; LENZ, 1987; LENZ et al., 1988). Em estudos realizados por Bellin et al., (1996) foram observados três tipos de proteínas caracterizadas como HBPs. Os autores mostraram que reprodutores com HBPs na membrana espermática eram mais férteis em relação aqueles em que as proteínas não eram detectadas. Os reprodutores com as três HBPs (30, 24 e 21 kDa) identificadas em suas membranas apresentavam maior fertilidade (81,5%). Quando a HBP de 24 kDa estava ausente, ocorria uma queda da fertilidade (61,3%) e quando não haviam HBPs em suas membranas, a fertilidade apresentava-se ainda mais baixa (41,9%).

A expressão de isoformas da BSP 30 kDa presente no fluido das glândulas sexuais acessórias de reprodutores bovinos holandeses foi relacionada à alta fertilidade *in vivo* por Moura et al. (2006a). Tal associação positiva com a fertilidade parece ser resultante da atuação dessa proteína na capacitação do espermatozoide e sobrevivência dos gametas masculinos no oviduto (MOURA et al., 2006a). As BSPs (*Binder of Sperm Proteins*) foram identificadas no plasma seminal de várias espécies, tais como, equinos (HSP1, HSP2, EQ12; CALVETE et al., 1995), suínos (pB1; CALVETE et al., 1997), caprinos (GSP14, GSP15, GSP20, GSP22 kDa; VILLEMURE et al., 2003), ovinos (RSVP14, RSVP20, RSP15, RSP22, RSP24; BERGERON et al., 2005; JOBIM et al., 2005) e bovinos (BSP-A1/ A2, (PDC-109), BSP-30kDa; MANJUNATH; SAIRAM, 1987; MANJUNATH; THERIEN, 2002). As BSPs são secretadas pelas glândulas vesiculares e ampolas e agem no processo de capacitação espermática. Elas apresentam o domínio fibronectina tipo II (ESCH et al., 1983; CALVETE

et al., 1996), os quais lhes conferem a capacidade de ligação aos fosfolípidos (MOREAU et al., 1998) e à heparina (CHANDONNET et al., 1990). Durante a ejaculação elas ligam-se à superfície dos espermatozoides mediante interações específicas com os resíduos de colina dos fosfolípidos da membrana espermática, mediando a capacitação através do efluxo de colesterol e fosfolípidos, assim, diminuindo a taxa colesterol/fosfolípidos levando ao influxo de cálcio, e ao aumento do pH intracelular (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; MÜLLER et al., 1998; THÉRIEN et al., 1999). Além disso, essas proteínas também se ligam à heparina e à HDL (lipoproteína de alta densidade) presentes no trato genital feminino e na membrana espermática (THÉRIEN et al., 1995; THÉRIEN et al., 1997), ocorrendo, portanto, uma segunda remoção de colesterol o que desestabiliza a membrana, iniciando as vias de transdução de sinais que regulam a expressão dos receptores para glicoproteínas da zona pelúcida, tornando os espermatozoides aptos à reação acrossômica (BENOFF et al., 1993; THÉRIEN et al., 1998).

A fosfolipase A2 (PLA2) também tem sido relacionada com a alta fertilidade de touros (MOURA et al., 2006). Esta enzima varia de 14 a 20 kDa e desempenha funções importantes na capacitação, na reação acrossômica e nas fases iniciais da fertilização, incluindo a fusão do espermatozoide com o oócito, sendo ativada pela interação com a zona pelúcida, além de exercer ação antimicrobiana no plasma seminal e participar de mecanismos intracelulares de mensageiros secundários (DENNIS, 1994; SOUBEYRAND et al., 1997). A PLA2 associada à membrana espermática participa da síntese de ácido araquidônico uma vez ativada pela progesterona,  $Ca^{2+}$  e proteína kinase C. O ácido araquidônico é convertido em prostaglandina E2 que leva ao fluxo de  $Ca^{2+}$  por meio da membrana espermática acarretando a fusão das membranas e a reação acrossômica. A fosfolipase A2 é uma enzima multifuncional e sua associação com a fertilidade pode resultar de vários fatores (MOURA et al., 2006a).

A osteopontina (OPN) é também uma das proteínas presentes no plasma seminal relacionada positivamente com a fertilidade de touros (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997; MOURA et al., 2006a). A OPN é uma glicoproteína de natureza ácida com peso molecular entre 25 e 75 kDa, rica em ácidos aspártico e glutâmico (SORENSEN; PETERSEN, 1994), sendo expressa nas células epiteliais das ampolas e glândulas vesiculares, em espermátides alongadas nos testículos, além do epidídimo e espermatozoides epididimários (SIITERI et al., 1995). A OPN se liga aos espermatozoides durante a ejaculação

(SOUZA et al., 2008) e atua na adesão celular, o que indica a sua participação na interação entre espermatozoide e oócito (GONÇALVES et al., 2007), no remodelamento de membranas, nas alterações do citoesqueleto e na modulação imunológica (DENHARDT, 2004). A osteopontina liga-se a várias integrinas através da sequência de aminoácidos RGD (arginina, glicina e aspartato) presentes na sua estrutura, o que permite sua participação na adesão e comunicação intracelular (DENHARDT et al., 2001). Uma hipótese atribuída para o mecanismo de ação da OPN na fertilização (MOURA, 2005) considera que, na ejaculação a OPN oriunda do fluido das glândulas sexuais acessórias liga-se à membrana do espermatozoide por meio das integrinas e o complexo OPN-integrinas interage com receptores na membrana oocitária (D'CRUZ, 1996). Essa hipótese pode ser confirmada pelo fato do fluido do oviduto bovino possuir OPN (GABLER et al., 2003), havendo a possibilidade de ligação das moléculas de osteopontina desse fluido com a membrana espermática. Além disso, a OPN também é capaz de se ligar ao receptor CD44 através de um domínio diferente da sequência RGD, e este receptor, na maioria das vezes, participa dos processos de adesão celular (CINCHY; PURÉ, 2003) sendo expresso tanto na membrana espermática (BAINS et al., 2002) quanto na oocitária (MONACO et al., 2009). A OPN também pode alterar as características da membrana plasmática do espermatozoide, o que também pode favorecer a fertilidade (CANCEL et al., 1999); e induzir a capacitação espermática, por meio de mecanismos indeterminados, apresentando igualmente um efeito positivo na viabilidade do espermatozoide, possivelmente através do bloqueio de vias apoptóticas (ERIKSON et al., 2007).

Em estudos realizados por Moura et al. (2007) foi constatado que o fluido das glândulas sexuais acessórias de touros Holstein de alta fertilidade apresentava uma maior quantidade de BSP A1/A2 e A3, BSP 30 kDa, PLA, osteopontina, clusterina e albumina e que a sua mistura com os espermatozoides de touros de baixa fertilidade aumentava a capacidade de penetração nos oócitos. A clusterina é uma glicoproteína que pode ser expressa na próstata, glândulas vesiculares, epidídimos, testículos (SYLVESTER et al., 1991; SENSIBAR et al., 1993), assim como na superfície da membrana da célula espermática do bovino e do homem (HOWES et al., 1998). Essa proteína está relacionada com vários processos fisiológicos, incluindo adesão e agregação celular (BLASCHUK et al., 1983), metabolismo de lipídeos, secreção endócrina (TENNISWOOD et al., 1992), maturação espermática (SYLVESTER et

al., 1991), proteção espermática (MERI et al., 2001), reabsorção dos espermatozoides defeituosos na cauda do epidídimo e modulação da lise celular (AKERLÖF et al., 1989, MATSUOKA et al., 2006). A clusterina também pode inibir a precipitação proteica induzida pelo estresse. Dessa forma, a clusterina expressa durante o estresse celular atua como uma chaperona, ligando-se a proteínas parcialmente desestruturadas, solubilizando-as e protegendo as células dos efeitos citotóxicos oriundos da precipitação proteica (IBRAHIM et al., 1999; BAILEY et al., 2002).

Com relação à albumina foi observado que a albumina sérica bovina, quando acrescentada aos espermatozoides epididimários incubados com o plasma, epididimário ou seminal estimulou a motilidade espermática (DOTT et al., 1979). Outras pesquisas relataram que a albumina sérica era favorável à motilidade no sêmen de suíno, ovino, equino e de coelho, todavia na motilidade do espermatozoide bovino havia pouco efeito (BASS et al., 1983). Além disso, a albumina, presente no trato genital da fêmea, promove o efluxo do colesterol e outros fosfolipídios de membrana que acontecem na capacitação espermática (DAVIS et al., 1979; VISCONTI et al., 1998; OSHEROFF et al., 1999; WU et al., 2001). A albumina participa de modificações da permeabilidade da membrana espermática (JOBIM et al., 2002). Ela é capaz de se ligar aos peróxidos de lipídeos reduzindo os efeitos danosos destes compostos na membrana espermática e na motilidade do espermatozoide (ALVAREZ; STOREY, 1995).

A Prostaglandina D-sintase tipo lipocalina (PGDS) também tem sido relacionada com a fertilidade, mas sua função é contraditória. Em estudos realizados por Killian et al. (1993) e Gerena et al. (1998) com touros holandeses houve uma maior expressão de PGDS no plasma seminal de touros de alta fertilidade avaliada *in vivo*. Fouchécourt et al. (2002) também verificaram altas concentrações de PGDS no sêmen de touros de alta fertilidade. Todavia, três isoformas da PGDS do fluido epididimário exibiram maior expressão em touros holandeses de baixa fertilidade (MOURA et al., 2006a). Pesquisas também mostram que anticorpos contra a PGDS ocasionam diminuições significativas nas taxas de fertilização *in vitro* de embriões bovinos (GONÇALVES et al., 2007), o que indica uma ação dessa proteína no processo de fertilização, contudo por meio de mecanismos ainda desconhecidos. A prostaglandina D, uma proteína de 26 kDa, pI 6,2, é a principal proteína secretada pelas células epiteliais do epidídimo em várias espécies: bovino (GERENA et al., 1998), ovino e

equino (FOUCHÉCOURT et al., 1999). Ela também está presente nas células epiteliais da ampola, células de Sertoli e Leydig, e ainda, foi localizada na região apical do acrossoma do espermatozoide ejaculado de touros (GERENA et al., 2000). Através de estudo imunocitoquímico, a localização específica da prostaglandina foi verificada no tecido intersticial testicular, nas células de Sertoli e nas células principais da cauda do epidídimo de ratos. Tal localização sugere que esta proteína tem um papel no desenvolvimento e maturação espermática (GERENA et al., 2000). Entretanto a exata função que a mesma exerce sobre os espermatozoides ainda não está esclarecida (MOURA et al., 2006b).

Killian et al. (1993) ao avaliarem o plasma seminal de touros da raça holandesa constataram um peptídeo de baixo peso molecular o qual se encontrava em grande quantidade em reprodutores de baixa fertilidade, esse foi denominado de fator antifertilidade, e posteriormente identificado como a espermedesina Z13 (MOURA et al., 2006a). As espermedesinas são um grupo de polipeptídeos que apresentam baixo peso molecular (12-16 kDa) e ligam-se à superfície do espermatozoide ejaculado (SANZ et al., 1992; TÖPFER-PETERSEN et al., 1998). Estas proteínas são capazes de interagir com alguns receptores de açúcar encontrados na superfície celular e estão relacionadas com a capacitação espermática, interação dos espermatozoides com o oviduto e também podem atuar como inibidores de proteinases e fosfolipídeos (TÖPFER-PETERSEN et al., 1998; TÖPFER-PETERSEN, 1999; CABALLERO et al., 2005). A espermedesina Z13 possui relação inversa com a fertilidade apresentando maior intensidade no fluido das glândulas sexuais acessórias de reprodutores bovinos com fertilidade inferior. Essa proteína possui 50% e 43% de homologia com a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP) e com inibidores da motilidade do plasma seminal de humanos e suínos, respectivamente (TEDESCHI et al., 2000; IWAMOTO et al., 1995). A aSFP liga-se apenas com a superfície do espermatozoide ejaculado sendo necessária a liberação desta proteína da membrana espermática para ocorrer a fertilização *in vitro*. Isto implica que a aSFP age como fator decapacitante do espermatozoide, ao invés de molécula de ligação à zona pelúcida, não apresentando função na interação entre gametas (DOSTALOVA et al., 1994). Os inibidores da motilidade influenciam a atividade da ATPase causando uma diminuição da frequência de movimento do flagelo e velocidade dos espermatozoides (IWAMOTO et al., 1995). Moura et al. (2006a) constataram que a baixa fertilidade de touros com níveis elevados de espermedesina Z13 pode estar relacionada à capacidade desta proteína

modificar aspectos da motilidade dos espermatozoides, devido à semelhança desta proteína com as espermadesinas do suíno e do homem. O estudo visando caracterizar em larga escala o conjunto dessas proteínas expressas em uma célula ou tecido denomina-se proteômica.

## 2.5 Proteômica

As proteínas possuem várias funções no organismo, elas atuam no controle da maior parte dos processos celulares que ocorrem em grande diversidade, podendo atuar como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e sinalizadores celulares (AEBERSOLD; MANN, 2003; DE SOUZA et al., 2003). Esses fatores estimularam e ampliaram o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo do conjunto de proteínas expressas (AEBERSOLD et al., 2000). Nesse contexto surge a proteômica, a qual consiste na identificação, quantificação e no estudo das modificações pós-traducionais do proteoma, ou seja, o conjunto de proteínas expressas em um genoma ou tecido; e no estudo das interações proteicas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK; WEIR, 1999).

Assim, a proteômica baseia-se em princípios bioquímicos, biofísicos e de bioinformática para quantificar e identificar as proteínas expressas, pois elas se modificam de acordo com o desenvolvimento de um organismo bem como em resposta aos fatores ambientais (ANDERSON; ANDERSON, 1996; WILKINS et al., 1996; WILKINS et al., 1997). A proteômica surgiu na década de 1970 quando pesquisadores começaram a criar as bases de dados de proteínas utilizando a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (O'FARREL, 1975). A pesquisa proteômica permite identificar e caracterizar marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificação dessas moléculas é bastante útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (CASH, 2002).

No que concerne à reprodução animal essa técnica tem sido empregada principalmente para a detecção de marcadores bioquímicos da fertilidade, como também da congelabilidade do sêmen. A análise proteômica dos espermatozoides proporciona maior entendimento das interações proteicas do plasma seminal com estas células. Portanto, a proteômica do sêmen é imprescindível para identificação de propriedades e funções das

proteínas envolvidas nos mecanismos de regulação das funções do trato reprodutivo masculino (STRZEZK et al., 2005).

A abordagem proteômica clássica é baseada especialmente, na separação das proteínas por eletroforese em gel bidimensional (2D), a qual separa as proteínas por dois parâmetros independentes: na primeira dimensão pelo ponto isoelétrico e na segunda dimensão pela massa molecular. A eletroforese bidimensional é um método fundamental, pois possibilita a visualização de um grande número de proteínas simultaneamente e suas distintas isoformas (HAYNES et al., 2000; LOW et al., 2002). No gel 2D os polipeptídeos aparecem formando manchas (*spots*). Os diferentes *spots* de proteínas obtidos podem ser removidos do gel, digeridos a peptídeos por proteases específicas e, em seguida, identificados usando a espectrometria de massa (STEEN; MANN, 2004).

A eletroforese em primeira dimensão é a caracterização da proteína sobre o seu ponto isoelétrico. Na focalização isoelétrica as proteínas são separadas, através de uma alta tensão, em um gradiente de pH imobilizado em um gel de acrilamida até alcançarem a posição estacionária onde a carga total é zero. O valor de pH no qual a proteína tem carga líquida zero é chamado de ponto isoelétrico (pI) (NELSON; COX, 2002). Após a eletroforese em primeira dimensão, as proteínas estarão separadas pelos seus pontos isoelétricos, todavia poderá ocorrer sobreposição de proteínas em um mesmo ponto isoelétrico, portanto é realizada uma segunda eletroforese (GLISH; VACHET, 2003). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas pelo peso molecular, através de uma tensão em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) o qual possui porosidade variada. A mobilidade eletroforética se dá de acordo como tamanho da proteína sendo restringida pelo tamanho do poro da matriz de poliacrilamida, de uma forma que as proteínas migram em uma velocidade proporcional ao seu tamanho (O'FARREL, 1975; ROCHA et al., 2005; WU et al., 2010a).

O método mais utilizado para identificação das proteínas é a espectrometria de massas a qual consiste na mensuração do peso molecular de átomos e moléculas. Primeiramente, as proteínas de interesse são recortadas do gel, são fragmentadas (obtenção dos peptídeos), geralmente por digestão trípica, e os fragmentos são analisados no espectrômetro de massa que, por sua vez, determina a massa da molécula mesurando a razão massa/carga do íon da molécula (SIUZDAK, 2006). Essa técnica baseia-se em três elementos básicos: uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector (GLISH; VACHET,



2003). Os principais tipos de ionização em espectrômetros de massa utilizados são: a ionização/dessorção da matriz assistida a laser (MALDI) e a ionização por eletrospray (ESI) (GLISH; VACHET, 2003;). A ionização por MALDI ocorre pelo bombardeamento da amostra por um feixe de laser onde ocorrerá a ionização e a dessorção da amostra possibilitando o percurso pelo espectrômetro de massas. A ionização por eletrospray (ESI) é provocada por pressurizar uma amostra líquida que é injetada no espectrômetro de massa por uma agulha aplicando-se um gradiente elétrico e separando os compostos carregados na sua superfície, formando um cone de spray, aumentando a superfície de contato do líquido o que favorece a repulsão eletrostática dos compostos ionizados. O analisador de massa avalia os íons na fase gasosa com a sua respectiva relação massa/carga ( $m/z$ ), onde a carga é produzida pela adição ou perda de prótons, cátions, ânions ou elétrons (SIUZDAK, 2006).

Os principais tipos de analisadores de massa são: Quadrupolo, onde é aplicado um campo magnético oscilatório em quatro polos por onde os íons formados passam e nesta passagem é calcula a relação  $m/z$  da amostra; e o Tempo de Voo (*Time of Flight* – ToF), onde os íons são acelerados em uma câmara e no final dessa há um refletor o qual reflete os íons para o detector, sendo calculada a sua relação  $m/z$  pelo tempo gasto na viagem do íon. Assim que os íons passam pelo analisador de massa, eles chegam ao detector de íons gerando um sinal de corrente. O mais comum é o Multiplicador de elétrons, que multiplica em 1.000.000 de vezes o sinal que chega (SIUZDAK, 2006). Posterior à obtenção dos espectros de massa, os dados obtidos são confrontados com bancos de dados internacionais, disponíveis na internet, para a identificação das proteínas por softwares específicos como o MASCOT (Matrix Science Inc., Boston, MA, EUA) (ZANG; CHAIT, 2000).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais e coleta

Seis carneiros adultos da raça Morada Nova com aproximadamente um ano e dois meses de idade pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram abatidos conforme normas do RISPOA (Brasil, 2008). Os testículos foram removidos e imediatamente dissecados e a cabeça do epidídimo separada do testículo para possibilitar o acesso aos ductos eferentes. Em seguida, coletou-se o fluido da *rete testis* com auxílio de uma pipeta massageando levemente o testículo (figura 3). Cada testículo apresentava um volume de fluido entre 8 e 13  $\mu\text{L}$  e foi feito um *pool* do par de testículos de cada animal. As amostras coletadas foram imediatamente centrifugadas a  $1500 \times g$  por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . O *pellet* formado apresentava uma coloração esbranquiçada contendo apenas células espermáticas, aqueles que exibiam um halo vermelho, indicando a presença de hemácias, eram descartados. Posteriormente, realizou-se uma segunda centrifugação ( $5000 \times g$  por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ) e o sobrenadante foi recolhido e precipitado com acetona 10 vezes o volume durante 2 horas a  $-20^\circ\text{C}$ . Após, o sobrenadante precipitado foi centrifugado a  $5000 \times g$  por 40 min a  $4^\circ$ , então, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco *overnight* a  $4^\circ\text{C}$  na geladeira e depois ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (7 M ureia, 2 M tiourea, 40 mM ditiotreitól (DTT), anfólitos livres 2% (IPG buffer, pH 4-7 (GE LifeSciences); 4% 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanossulfonato).

### 3.2 Quantificação da concentração da proteína total no fluido da *rete testis*

Primeiramente, uma curva analítica de calibração foi obtida a partir de soluções padrões, com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). A cada 20  $\mu\text{L}$  padrão acrescentou-se 1,0 mL do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) e as leituras de absorbância foram feitas a 595 nm (Ultraspec III, GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA). A curva de calibração foi estabelecida pelas médias das duplicatas das absorbâncias obtidas, originando uma equação linear de absorbância versus concentração ( $R^2 = 0,983$ ) por meio da qual foi possível a determinação do teor de proteínas totais em cada uma das amostras experimentais. Para quantificar os teores de proteína, as amostras experimentais, também em

duplicatas, foram antecipadamente diluídas na proporção de 1:30 em água ultrapura (Direct-Q/ Millipore, Billerica, MA, USA). Vinte microlitros da amostra foram adicionados a 1,0 mL do reagente de Bradford. As leituras em 595 nm (Ultraspec III, GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA) foram feitas e a média das duplicatas usadas para o cálculo da concentração total de proteína de cada amostra.

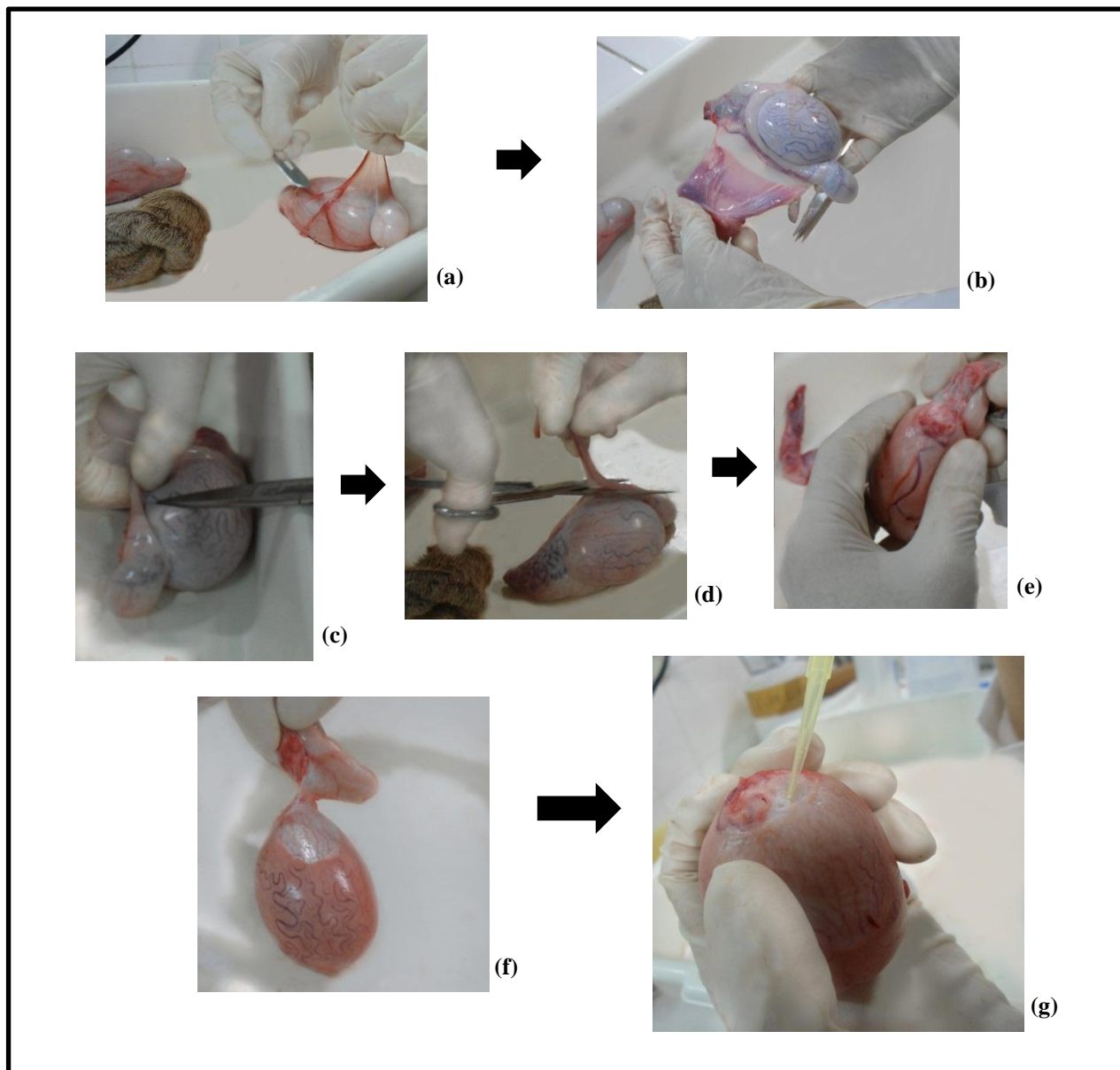


Figura 3. Dissecção do testículo e coleta do fluido da *rete testis* de ovinos Morada Nova. (a) e (b): remoção da túnica albugínea; (c) e (d): separação do epidídimo e ducto deferente; (e) e (f): separação da cabeça do epidídimo; (g): coleta do fluido da *rete testis*.

### 3.3 Eletroforese bidimensional do fluido da *rete testis*

Cada amostra contendo 400 µg de proteínas foi acrescida de uma solução de re-hidratação (ureia 7 M, tiourea 2 M, ditioneitol (DTT) 65 mM, anfólitos livres 0,5% (IPG buffer, 3-10), CHAPS 0,5% e azul de bromofenol (traços)) satisfatória para 250 µL (VAN TILBURG et al., 2014). Essa solução foi adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubada com tiras de 13 cm com gradiente de pH imobilizado linear de 4 – 7 (IPGs; GE Lifesciences, USA) por 18 horas. A focalização isoeétrica foi conduzida em um equipamento ETTAN™ IPGphorII™ (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.

Após a focalização as tiras foram mantidas por 15 minutos sob leve agitação em tubos de ensaio com um tampão de equilíbrio I (6 M de ureia, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3% de glicerol, 2% de SDS, DTT a 1%) e reequilibradas durante mais 15 minutos em um segundo tampão (semelhante ao tampão de equilíbrio I, mas contendo iodoacetamida 2,5% em vez de DTT). Depois da etapa de equilíbrio, as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (SE 600 Ruby—Amersham Biosciences, USA) com uma corrente de 25 mA por gel e uma tensão máxima de 500 V (Hoefer SE 600; GE LifeSciences). Foi acrescido um marcador molecular com as seguintes massas moleculares: 12 kDa, 17 kDa, 24 kDa, 31 kDa, 38 kDa, 52 kDa, 76 kDa, 102 kDa, 150 kDa e 225 kDa (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers; GE LifeSciences, USA). As proteínas foram visualizadas empregando-se o método do Coomassie coloidal.

Resumidamente, os géis foram lavados três vezes por 20 minutos, na seguinte solução: 30 mL de ácido fosfórico 2% ressuspensionado para 1,5 mL de água destilada (500 mL/gel). Após a última lavagem foi adicionada a solução de coloração composta por: 16 mL de ácido fosfórico 2%, 144 mL de etanol 18% e 120 g de sulfato de amônia 15% ressuspensionados para 800 mL de água destilada. Decorridos 30 minutos, acrescentou-se a esta solução 16 mL de Coomassie Blue G-250 (solução aquosa a 2%). O corante permaneceu em contato com os géis por aproximadamente 120 horas. Depois deste período, descartou-se a solução contendo o corante e os géis foram lavados com água destilada (VAN TILBURG et al., 2013).

### 3.4 Digitalização e análise dos géis

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando 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). Baseando-se nos géis de todos os indivíduos foi gerado um gel representativo. 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., 2006a).

### 3.5 Digestão das proteínas

As proteínas separadas por eletroforese bidimensional foram digeridas com tripsina segundo metodologia descrita por (MOURA et al., 2006a; VAN TILBURG et al., 2013). 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 solução foi retirada 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.

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

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  $\mu$ L) 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 300<sup>TM</sup> (C-18, filme de 5  $\mu$ m; 0,3 mm  $\times$  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  $\times$  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 tripticos 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.

### 3.7 Pesquisa em banco de dados e classificação das proteínas

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  $\pm 1.2$  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.

- Ontologia gênica

A informação sobre a proteína adquirida pela busca no MASCOT foi analisada através da utilização do programa para anotações de proteínas (STRAP), um aplicativo de código-fonte aberto (BATHIA et al., 2009; REGO et al., 2014). Os termos da ontologia gênica para os processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares foram adquiridos do banco de dados UniProtKB.

### **3.8 Análise das redes de interação das proteínas**

As interações interproteicas foram analisadas por meio do banco de dados STRING 9.0 (<http://string-db.org>) (SNEL et al., 2000), a partir de predições coletadas baseando-se em associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais), integrando evidências de várias fontes, bem como contexto genômico, experimentos em larga escala, co-expressão e dados obtidos a partir de publicações de pesquisa (SZKLARCZYK et al., 2011; REGO et al., 2014). A análise das redes de interação só foi realizada para as proteínas mais expressas no fluido da *rete testis*, baseando-se no percentual de intensidade e quantidade de *spots*.

### 3. RESULTADOS

#### 4.1 Eletroforese 2D e identificação das proteínas por espectrometria de massa ESI-Q-Tof (*Electrospray ionization quadrupole-time-of-flight*)

Detectou-se nos géis do fluido da *rete testis* de ovinos Morada Nova uma média de  $227 \pm 32,1$  *spots* (Figura 4), onde 51% das proteínas se encontraram acima de 40 kDa representando 65% da intensidade de todos os *spots* detectados nos géis. Quatorze *spots* mais intensos com massa molecular entre 65 kDa e 83 kDa corresponderam a 23% da intensidade das proteínas totais. Setenta e seis *spots*, identificados por espectrometria de massa (ESI-Q-Tof), corresponderam a quarenta e oito proteínas distintas (Tabela 1, em anexo). Estes, por sua vez, representaram 46,3% da intensidade de todos os *spots* detectados nos géis. As proteínas mais expressas, de acordo com o percentual da intensidade e números de spots, detectadas nos géis foram: albumina (65-83 kDa/ pI 5,45-6,46); clusterina (34,25-38,27 kDa/ pI 4,35-4,52); serotransferrina (78,8-82,82 kDa/ pI 5,72-6,53); imunoglobulina gama 1 (46,59-47,77 kDa/ pI 5,80-6,27); alfa-2-HS-glicoproteína (56,21-57,53 kDa/ pI 4,59-4,80), cujas intensidades dos respectivos spots corresponderam, respectivamente, a 14%, 4,2%, 3,1%, 3,1% e 2,7% da intensidade total dos *spots* detectados nos géis. Os percentuais da intensidade das demais proteínas identificadas no estudo são mostrados na Tabela 2.

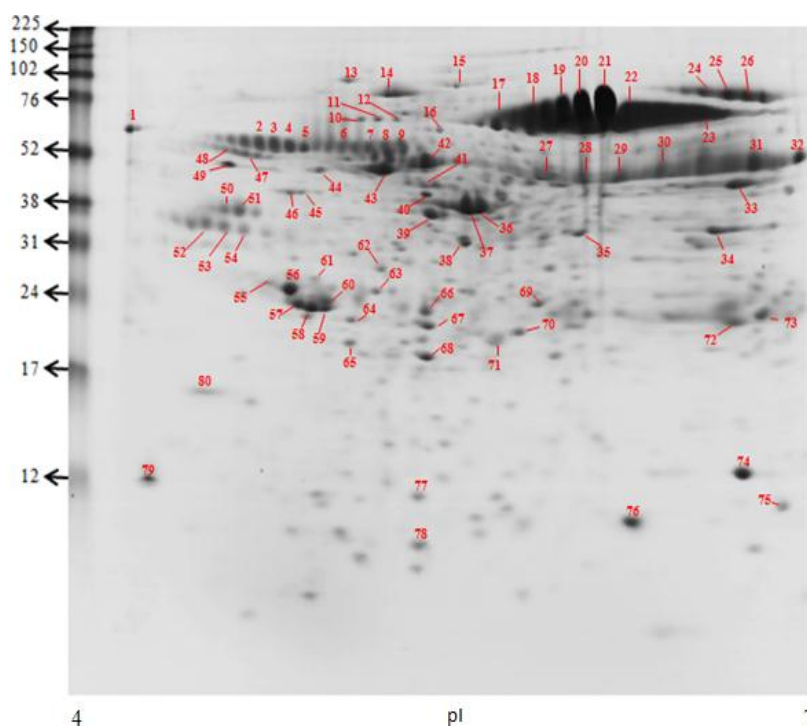


Figura 4. Gel bidimensional das proteínas do fluido da *rete testis* de carneiros Morada Nova. O mapa representa o gel referência utilizado para gerar o master gel através do aplicativo PDQuest software (versão 7.3.0; Bio-Rad). Os spots numerados referem-se aos apresentados na Tabela 1 em anexo.



Tabela 2. Percentual da intensidade das proteínas identificadas no fluido da *rete testis* de ovinos Morada Nova.

<b>Proteína</b>	<b>Intensidade (%)</b>
Alfa-1-antiproteinase	2,3
Beta actina	2,24
Proteína de ligação à vitamina D	1,76
Retinal desidrogenase	1,75
14-3-3 eta	1,18
Alfa enolase	1,11
Tubulina beta-2 <sup>a</sup>	1,04
Glutathiona-S-transferase	0,95
HSP70	0,87
HSC71	0,87
Tubulina alfa-1B	0,84
Prostaglandina-H2 D-isomerase	0,68
Transtirretina	0,64
serpina A3-1	0,61
Complemento C3	0,53
Pseudouridina-5'-monofosfatase	0,51
Alfa-1-beta-glicoproteína	0,5
Superóxido dismutase	0,45
Aldose redutase	0,35
Prostaglandina E-sintase citosólica	0,27
F-actina <i>capping</i> proteína	0,26
14-3-3 epsilon	0,25
Rho GDP-inibidor de dissociação 1	0,22
Peroxirredoxina-2	0,22
Hemoglobina subunidade beta	0,22
Proteassoma	0,21
Tioredoxina	0,20
Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase isoenzima 1	0,19
Serpina A3-5	0,19
Endoplasmina	0,17
E1 ativadora da NEDD8	0,17
Proteína de tumor controlado-traducionalmente	0,14
Proteína de ligação ao retinol	0,14
Proteína semelhante ao fator de transcrição de zíper de leucina	0,14
Alfa-S1-caseína	0,14
Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase isoenzima 3	0,13
Aminoacilase	0,13
Enolase fosfatase E1	0,12
Proteína ativadora de Ran-GTPase	0,11
Proteína TSSC1	0,10
Plastina-2	0,082
Proteína transição retículo endoplasmático ATPase	0,063
IgM	0,0057

## 4.2 Análise da ontologia gênica

A maioria das quarenta e oito proteínas identificadas no fluido da *rete testis* é componente do meio extracelular (26%), citoplasma (20%) e núcleo (13%; Figura 5). Tais proteínas atuam principalmente em processos biológicos associados à regulação (28%), processos celulares (26%) e resposta a estímulos (12%) e apresentam funções de ligação (41%), atividade catalítica (29%) e regulação enzimática (11%).

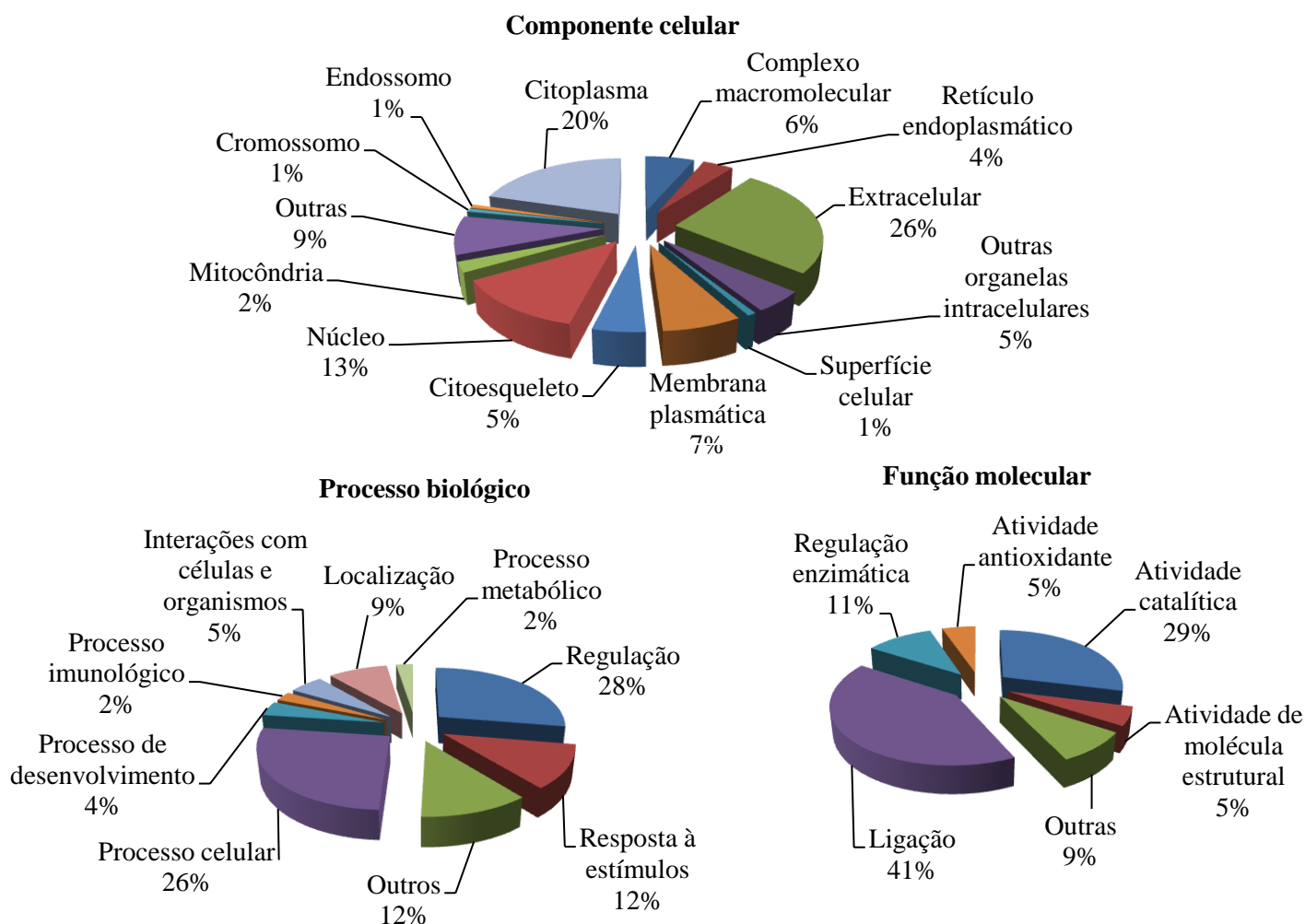


Figura 5. Gráficos das anotações da ontologia gênica das proteínas do fluido da *rete testis* de carneiros Morada Nova com base nos componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos. As proteínas identificadas por espectrometria de massa foram analisadas pelo STRAP. Os termos da ontologia gênica foram obtidos a partir do banco de dados UniProtKB.

### 4.3 Análise das redes de interação das proteínas

Os interactomas das cinco proteínas expressas em maior quantidade no fluido da *rete testis* de carneiros Morada Nova são mostrados (figuras 6, 7, 8, 9 e 10). As proteínas foram analisadas com o software STRING. A pesquisa das interações foi estabelecida em *medium confidence*.

A análise *in silico* das interações da albumina mostrou que a mesma interage com proteínas envolvidas na supressão de tumor (óxido nítrico sintase induzível, fator de necrose tumoral); adesão celular (fibronectina); transporte (citocromo C, insulina); sinalização (leptina), desfosforilação (fosfatase alcalina); produção de pigmentos (tirosinase) e endocitose (alfa-2HS-glicoproteína).

A clusterina apresenta interações com proteínas que atuam em atividades proteolíticas (plasminogênio, serpina E1, serpina F2) e inibitórias (inibidor de metaloproteinase 1, alfa-2-macroglobulina); regulação do crescimento celular (proteína ácida secretada rica em cisteína); transporte (lactotransferrina); sinalização celular (amiloide beta) e adesão celular (fibronectina).

As proteínas de ligação (transtirretina, proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 3, albumina); receptores de transferrina (receptor de transferrina, receptor de transferrina 2); proteínas transportadoras (apolipoproteína A1) e inibidoras (proteína AMPB); proteínas associadas com a endocitose (alfa-2HS-glicoproteína) e resposta imunológica (C9) fazem parte da rede de interações da serotransferrina, um dos componentes do fluido da *rete testis* dos ovinos Morada Nova.

A imunoglobulina gama1 apresenta principal interação com proteínas envolvidas na resposta imunológica (imunoglobulina lambda constante 1, putativo IGLV3-21, fragmento Fc de IgG de baixa afinidade 3B, imunoglobulina kappa variável 4-1, imunoglobulina pesada variável 1-69, componente 3 do complemento, imunoglobulina kappa constante, proteína ligante de CD40, molécula de CD4, fragmento Fc de IgG de baixa afinidade 3A).

A alfa-2-HS-glicoproteína, por sua vez, exhibe associações com proteínas que possuem atividade catalítica (sialidase-1, calpaína-2 subunidade catalítica) e proteolítica (plasminogênio, metaloproteinase de matriz-9); proteínas de ligação (albumina, apolipoproteína H) e associadas à resposta imunológica (alfa-1-glicoproteína ácida).

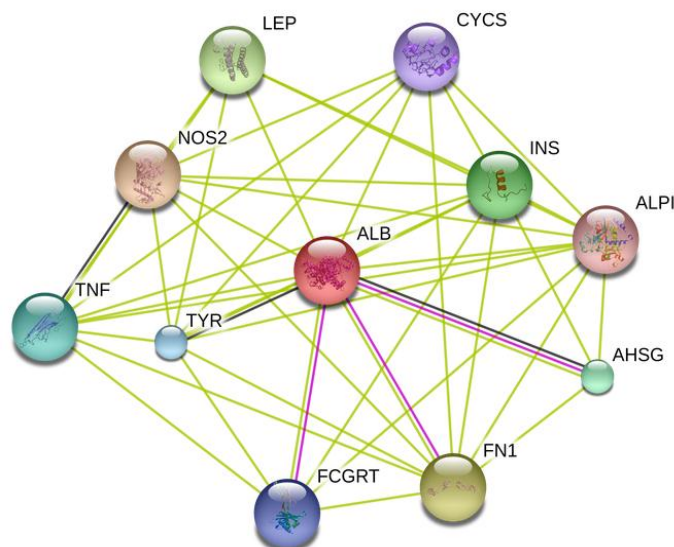


Figura 6. Análise *in silico* das interações da albumina (ALB). Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação. (—) Co-expressão; (—) experimentos; (—) *textmining*. CYCS (citocromo C); LEP (leptina); INS (insulina); NOS (óxido nítrico sintase, induzível); TNF (fator de necrose tumoral); TYR (tirosinase); ALPI (fosfatase alcalina); AHSG (alfa-2HS-glicoproteína); FN1 (fibronectina); FCGRT (fragmento Fc da IgG).

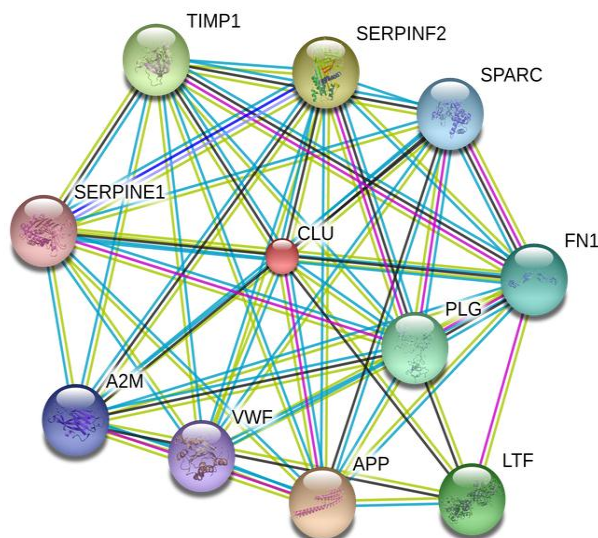


Figura 7. Análise *in silico* das interações da clusterina (CLU). Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação. (—) Co-expressão; (—) experimentos; (—) *textmining*; (—) co-ocorrência; (—) banco de dados e (—) homologia. SERPINE1 (serpina E1); TIMP1 (inibidor de metaloproteinase 1); SERPINF2 (serpina F2); SPARC (proteína ácida secretada rica em cisteína); A2M (alfa-2-macroglobulina); PLG (plasminogênio); APP (amiloide beta); VWF (fator de von Willebrand); LTF (lactotransferrina); FN1 (fibronectina).

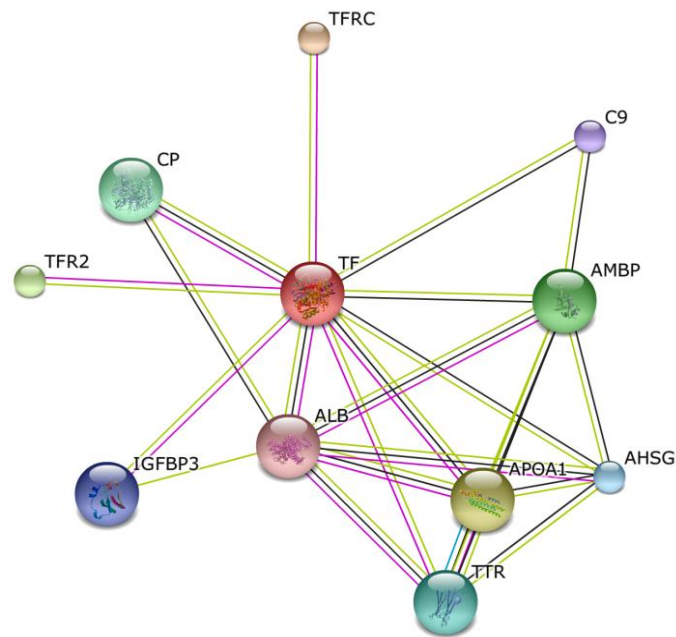


Figura 8. Análise *in silico* das interações da serotransferrina (TF). Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação. (—) Co-expressão; (—) experimentos; (—) *textmining*; (—) banco de dados. TFRC (receptor de transferrina); CP (fragmento da proteína PB); TFR2 (receptor de transferrina 2); IGFBP-3 (proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina 3); ABL (albumina); TTR (transtirretina); APOA1 (apolipoproteína A1); AMBP (proteína AMPB); C9 (componente 9 do complemento); AHSG (alfa-2HS-glicoproteína).

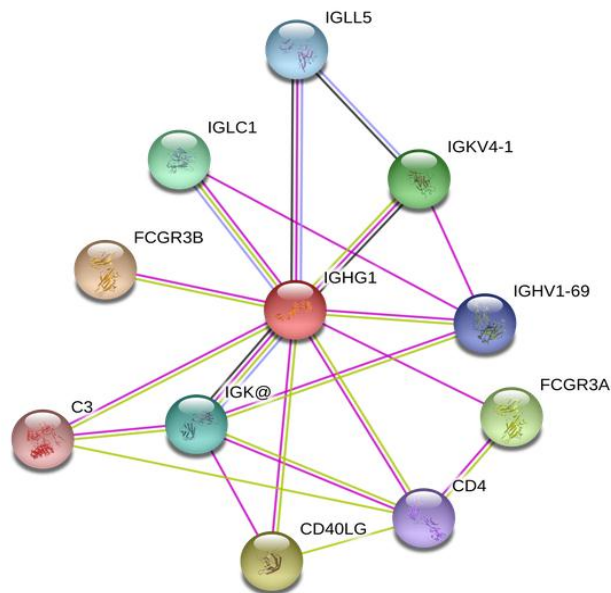


Figura 9. Análise *in silico* das interações da imunoglobulina gama 1 (IGHG1). Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação. (—) Co-expressão; (—) experimentos; (—) *textmining*; (—) banco de dados e (—) homologia. IGLL5 (putativo

IGLV3-21); FCGR3B (fragmento Fc de IgG, baixa afinidade 3B); IGKV4-1 (imunoglobulina variável kappa 4-1); IGHV1-69 (imunoglobulina pesada variável 1-69); C3 (componente 3 do complemento); IGK@ (imunoglobulina kapa constante); CD40LG (proteína ligante de CD40); CD4 (molécula de CD4); FCGR3A (fragmento Fc de IgG, baixa afinidade 3A); IGLC1 (imunoglobulina lambda constante 1).

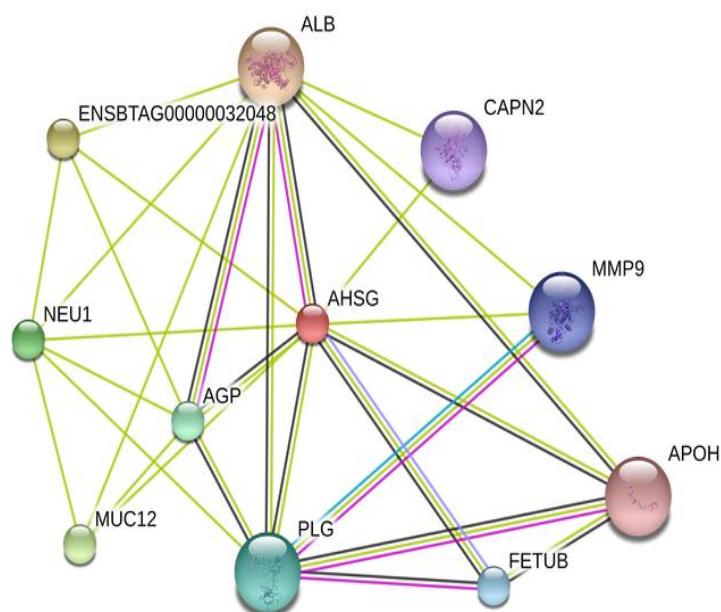


Figura 10. Análise *in silico* das interações da alfa-2-HS-glicoproteína (AHSG). Linha de cores diferentes representa os tipos de evidências para a associação. (—) Co-expressão; (—) experimentos; (—) *textmining*; (—) banco de dados e (—) homologia. ENSBTA (submaxilar mucina); NEU1 (sialidase-1); AGP (alfa-1-glicoproteína ácida); MUC12 (proteína semelhante à submaxilar mucina); FETUB (fetuína-B); APOH (apolipoproteína H); MMP9 (metaloproteinase de matriz-9); ALB (albumina); CAPN2 (calpaína-2 subunidade catalítica); PLG (plasminogênio).

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi caracterizado o perfil proteico do fluido da *rete testis* de carneiros Morada Nova. A raça Morada Nova compreende uma das principais raças nativas de ovinos deslanados presente no Nordeste do Brasil e possui alto potencial de adaptação às condições climáticas do semiárido. Sua exploração tem como finalidade a produção de carne e pele.

Também foram descritos, neste estudo, a ontologia gênica, as redes de interações das proteínas mais expressas e a identificação de vários destes componentes detectados nos géis bidimensionais. Utilizando a espectrometria de massa (ESI-Q-Tof), setenta e seis *spots* foram identificados e corresponderam a quarenta e oito proteínas distintas, as quais apresentam diversidade funcional de acordo com a ontologia gênica.

Os principais processos biológicos em que estas moléculas atuam estão associados à regulação (28%), processos celulares (26%) e resposta à estímulos (12%) e grande parte apresenta funções de ligação (41%), atividade catalítica (29%) e regulação enzimática (11%). Estes dados estão de acordo com os achados por Souza et al. (2012) utilizando amostras de plasma seminal e fluido da cauda do epidídimo de carneiros Santa Inês. Em estudos realizados por Van Tilburg et al. (2013) com proteínas de membrana de espermatozoides de carneiros Morada Nova também foi mostrado que a maioria apresenta como principais funções: ligação e atividade catalítica, e processos biológicos associados à processos celulares e resposta à estímulos. A maior parte das proteínas identificadas, no presente estudo, é componente do meio extracelular (26%), citoplasma (20%) e núcleo (13%). No fluido da *rete testis* (FRT) também são encontradas diversas células espermáticas e a presença de muitas proteínas que compõem o citoplasma e o núcleo pode ser resultado do extravasamento de células defeituosas. As proteínas mais expressas detectadas no FRT foram: albumina, clusterina, serotransferrina e alfa-2HS-glicoproteína. Segundo Skinner et al. (1987), a albumina, clusterina, transferrina e a IgG parecem ser responsáveis por cerca da metade das principais proteínas presentes no FRT.

As moléculas identificadas no FRT estão relacionadas a diversos processos fisiológicos, e serão apresentadas de acordo com diferentes grupos funcionais aos quais pertencem, conforme listado na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação das proteínas identificadas no fluido da *rete testis* com base na sua função.

<b>Espermatogênese</b>	<b>Proteção espermática</b>	<b>Motilidade espermática</b>	<b>Capacitação espermática</b>	<b>Proteases e inibidores</b>	<b>Enzimas glicolíticas</b>	<b>Outras proteínas identificadas no fluido da <i>rete testis</i></b>
Proteína de ligação à vitamina D	Superóxido dismutase	14-3-3 eta	Beta-actina	Serpina A3-1	Alfa enolase	Aminoacilase
Retinal desidrogenase	Peroxirredoxina	14-3-3 epsilon	F-actina	Alfa-1-antiproteínase	Enolase fosfatase	Alfa-S1-caseína
Proteína de ligação ao retinol	Glutathione S-transferase	Tubulina cadeia alfa-1B	Endoplasmina	Proteassoma		Plastina
Transtirretina	Tioredoxina	Tubulina cadeia beta-2 <sup>a</sup>	Tubulina cadeia alfa-1B	Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L1		IgG1
Proteína de tumor controlado-traducionalmente	Serotransferrina		Tubulina cadeia beta-2 <sup>a</sup>	Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L3		IgM
Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L1	Albumina		Inibidor de dissociação Rho-GDP	NEDD8-ativador da enzima E1		C3
Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L3	Clusterina			Proteína transição retículo endoplasmático ATPase		Proteína TSSC1
Prostaglandina E sintase citosólica	HSP70			Serpina A3-5		Hemoglobina beta
Prostaglandina-H2 D-isomerase	HSC71			Alfa-2-HS-glicoproteína		Proteína semelhante ao fator de transcrição de zíper de leucina
Proteassoma	Aldose redutase					Pseudouridina-5'-monofosfatase
						Proteína ativadora de Ran-GTPase



## 5.1 Proteínas associadas à espermatogênese

A proteína de ligação à vitamina D, alternativamente denominada Gc-globulina atua como uma proteína transportadora da vitamina D e seus metabólitos os quais, por sua vez, exercem um efeito indireto sobre a fertilidade masculina, agindo sobre os tecidos-alvo e regulando os níveis de cálcio em tecidos reprodutivos (UHLAND et al., 1992). Estudos realizados em ratos e humanos têm demonstrado a expressão de receptores de vitamina D em células de Leydig, células de Sertoli, túbulos seminíferos e epidídimo, sugerindo que a vitamina D pode estar envolvida na espermatogênese e maturação espermática (MERKE et al., 1985; JOHNSON et al., 1996; HIRAI et al., 2009). A célula de Sertoli é o principal local de ação para a vitamina D (OSMUNDSEN et al. 1989), onde a vitamina D parece estimular a absorção de cálcio através da atividade de um receptor nuclear (MENEGAZ et al., 2010).

Três proteínas envolvidas no metabolismo da vitamina A foram detectadas no fluido da *rete testis*: retinal desidrogenase (ALDH1A1), proteína de ligação ao retinol (RBP1) e a transtirretina (TTR). A vitamina A (retinol) possui importante papel na espermatogênese e sua deficiência induz a infertilidade e interrupção da espermatogênese (CHIHARA et al., 2013). A vitamina A é convertida a ácido retinóico em células germinativas e de Sertoli através da atividade da retinal desidrogenase (NAPOLI, 2000; KOUBOVA et al., 2006). A retinal desidrogenase ou aldeído desidrogenase (ALDH1A1) é expressa em células de Leydig, Sertoli e germinativas (VERNET et al., 2006), e possui atuação no processo final da biossíntese de ácido retinóico, catalisando a conversão de retinaldeído em ácido retinóico. Estudos indicam que homens inférteis apresentam níveis reduzidos da proteína ALDH1 no tecido testicular (AMORY et al., 2014). A RBP1 participa do transporte intracelular de retinol molécula essencial para a manutenção do epitélio germinativo e o processo da espermatogênese (ESKILD; HANSSON, 1994). Esta molécula está presente em níveis relativamente elevados nas células de Sertoli (PORTER et al., 1985) e pode formar um complexo com a transtirretina (TTR), a qual possui função de transportar de retinol e tiroxina (T4) (VIEIRA; SARAIVA, 2014). O complexo TTR-RBP é uma forma estável de transporte do retinol, permitindo o seu fornecimento às células (NOY et al., 1992). O retinol circulante é ligado à RBP e complexado com a TTR e posteriormente transportado para as células de Sertoli através das células mióides peritubulares que circundam os túbulos seminíferos (KANAI et al., 1968).

A proteína de tumor controlado-traducionalmente (TCTP) é uma proteína multifuncional que desempenha importantes funções em diversos eventos fisiológicos celulares, tais como a resposta imune, proliferação celular, estabilização de microtúbulos, a tumorigenicidade, e a morte celular, incluindo a apoptose. Em mamíferos, a TCTP é expressa ubiquamente em diversos tecidos e em células dos pulmões, rins, embrionárias, dentre outras (CANS et al., 2003; LIU et al., 2005). Estudos realizados por Guillaume et al. (2001), sugerem que essa proteína esteja relacionada com a espermatogênese, uma vez que apresentou um elevado nível de expressão em espermatogônias, em células peritubulares e células de Leydig de ratos. A TCTP também foi expressa em espermátides e em pequenas quantidades em células de Sertoli, fato que evidencia a participação desta proteína na divisão e diferenciação das células germinativas.

Grandes quantidades de prostaglandinas são relatadas no trato reprodutor masculino e no plasma seminal, desempenhando importantes funções em vários processos (GEROZISSIS et al., 1982). Uma alta concentração de prostaglandina E2 (PGE2) é fundamental para os processos de maturação espermática e transporte dos espermatozoides (LAZARUS et al., 2002). Sugere-se que a PGE2 pode estar associada à conversão de espermátocitos em espermátides (DIDOLKAR; ROYCHOWDHURY, 1980). Pesquisas relataram que o tratamento com PGE2 aumenta a motilidade do espermatozoide humano e a capacidade de penetração (AITKEN; KELLY, 1985). A prostaglandina E sintase citosólica (cPGES) catalisa a oxirredução da prostaglandina endoperóxido H2 (PGH2) a prostaglandina E2 (PGE2). Em estudos realizados por Zhang et al. (2012), um elevado nível de cPGES foi detectado em espermátocitos e espermátides de ratos, sugerindo que esse nível mantém uma grande quantidade de PGE2 nos túbulos seminíferos a qual pode ser acoplada no ciclo espermatogênico.

Outra prostaglandina detectada no estudo foi a prostaglandina-H2 D-isomerase também conhecida por prostaglandina D- sintase tipo lipocalina ou prostaglandina-D2 sintase a qual tem sido relatada como a principal proteína secretada pelo epidídimo em várias espécies de mamíferos (FOUCHÉCOURT et al., 2002). Ela pertence à superfamília lipocalina que consiste de um grupo de proteínas as quais se ligam a pequenas moléculas hidrofóbicas e receptores específicos da superfície celular (NAGATA et al., 1991; URADE et al., 1995). A PGDS foi identificada no fluido da *rete testis* de touros, carneiros e garanhões (GERENA et

al., 1998; FOUCHÉCOURT et al., 1999), em espermátides alongadas, células de Sertoli e células epiteliais cúbicas da *rete testis* de touros (GERENA et al., 2000). Essa proteína tem sido associada com a fertilidade de machos, todavia seu papel ainda não está totalmente esclarecido. Em geral, a associação com a fertilidade parece resultar da sua ação no desenvolvimento e maturação espermática. A PGDS atua no transporte intercelular de retinóides e substâncias lipofílicas para as células germinativas em desenvolvimento nos túbulos seminíferos (URADE; HAYAISHI, 2000). Os retinóides são necessários para a espermatogênese, o crescimento normal de células, a diferenciação e manutenção da integridade epitelial, provavelmente a PGDS pode facilitar a absorção dos retinóides dentro dos órgãos genitais masculinos (GERENA et al., 1998).

## 5.2 Proteínas associadas à proteção espermática

O plasma seminal tem como principais funções fornecer um meio de transporte e sobrevivência para os espermatozoides, bem como proteger os mesmos contra a resposta imune feminina (WITE, 1988). Os espermatozoides produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) através da atividade metabólica normal (ALVAREZ et al., 1987; AITKEN et al., 1989) e uma concentração elevada de ROS resultante da sua hiperprodução ou redução dos mecanismos de defesa antioxidantes ocasiona o estresse oxidativo (PASQUALOTTO et al., 2000), o qual provoca diminuição da função e viabilidade espermática (ALVAREZ et al., 1987; SHARMA et al., 1999). Proteínas que neutralizam as ações das ROS, atuando como antioxidantes e prevenindo o estresse oxidativo encontradas no FRT incluem a superóxido dismutase, peroxirredoxina, glutathione S-transferase, tioredoxina, serotransferrina e albumina.

As enzimas superóxido dismutases são metaloproteínas classificadas de acordo com o metal presente no sítio ativo. A cobre-zinco superóxido dismutase (SOD1) incorpora simultaneamente cobre e zinco no seu sítio ativo (TAINER et al., 1982). A presença do cobre possui como função facilitar a transferência de elétrons durante a atividade catalítica da proteína, (ERMILOVA et al., 2005), enquanto o zinco é essencial para manter a estrutura da mesma (JOHNSON; GIULIVI, 2005). A SOD1 catalisa a reação de dismutação, em que a primeira molécula de superóxido é oxidada e a segunda molécula é reduzida, transformando duas moléculas de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e promovendo, portanto, a proteção dos fosfolipídios da membrana espermática (LIPPARD, 1994). As

peroxirredoxinas (Prx) pertencem a uma família de enzimas antioxidantes que estão envolvidas na degradação de diversos peróxidos, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peróxidos orgânicos e peróxinitrito. Assim, contribuindo contra o estresse oxidativo (FLOHÉ; HARRIS, 2007).

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (MEISTER, 1994; SIES, 1997) e desempenha várias funções na célula: participa do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática e da regeneração do ácido ascórbico e serve como cofator de diversas enzimas antioxidantes (MEISTER, 1994; MAHER, 2005; VALKO et al., 2007). A glutatona S-transferase (GST) representa uma importante enzima de detoxificação celular, pois catalisa a conjugação da glutatona reduzida (GSH) com compostos endógenos ou exógenos, com a finalidade de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados (CARLETTI et al. 2008; HUBER; ALMEIDA, 2008).

As tioredoxinas são proteínas termoestáveis que participam de reações redox através da oxidação reversível dos dois resíduos de cisteína presentes em seu sítio ativo (HOLMGREN, 1985). Esta molécula apresenta uma importante função na defesa contra o estresse oxidativo atuando como doadora de elétrons para as peroxirredoxinas ou tioredoxina peroxidases, que catalisam a redução de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (KANG et al., 1998).

A serotransferrina é uma glicoproteína que possui propriedade de ligação com o ferro (WILLIAMS, 1985) e interage com receptores de transferrina, como mostrado no modelo *in silico* do interactoma, e com a proteína AMPB a qual inibe a elastase, componente envolvido na degradação do espermatozoide. A serotransferrina atua na prevenção do estresse oxidativo através da redução da disponibilidade de ferro iônico livre, assim evitando a formação de peróxidos lipídicos (WAKABAYASHI et al., 1999; AGARWAL; PRABAKARAN, 2005) e prevenção do crescimento microbiano, uma vez que o ferro livre é um elemento fundamental para o crescimento de bactérias (KOKHAN, 2010).

A albumina atua na proteção espermática absorvendo os peróxidos de lipídeos, portanto diminuindo os danos ocasionados por esses compostos na membrana do espermatozoide (ALVAREZ; STOREY, 1995). Como mostrado no interactoma, esta proteína se liga à enzima óxido nítrico sintase induzível a qual participa da síntese de óxido nítrico

molécula com ação citotóxica (ROSETE et al., 1999). A albumina é expressa nos epidídimos e glândulas sexuais acessórias (DACHEUX et al., 2009; MOURA et al., 2010b), e de acordo com Skinner et al.(1987) a albumina (68 kDa) foi identificada como a principal proteína do fluido da *rete testis* de carneiros.

Foram identificados cinco spots referentes à proteína clusterina, glicoproteína multifuncional relacionada com diversos processos fisiológicos. Esta proteína é expressa nos testículos, epidídimos, glândulas vesiculares, próstata e membrana do espermatozoide de bovinos (LÉGER et al., 1987; SYLVESTER et al., 1991; SENSIBAR et al., 1993; BRAUNDMEIER; MILLER, 2001). A clusterina é secretada pelas células de Sertoli principalmente na porção adluminal do epitélio seminífero, sendo liberada para o lúmen do túbulo, e, em seguida, transportada para a *rete testis* (FRITZ, 1985). No entanto, estudos realizados por Tung e Fritz (1985) indicaram que as células epiteliais da *rete testis* também são capazes de sintetizar clusterina, ou ainda, absorver a clusterina a partir do fluido da *rete testis*, no entanto a absorção por meio dessas células parece ser mínima. Através da utilização de culturas enriquecidas de células da *rete testis* de carneiros, estes mesmos autores observaram que tais células sintetizam clusterina a uma extensão comparável à detectada em preparações de culturas enriquecidas com células de Sertoli. Algumas funções desta proteína incluem: proteção espermática contra os efeitos citotóxicos da precipitação proteica (MERI et al., 2001), adesão e agregação celular, transporte de lipídeos (DE SILVA et al., 1990), maturação dos espermatozoides (SYLVESTER et al., 1991), remodelamento da membrana durante o processo de apoptose (TENNISWOOD et al., 1992), reabsorção de espermatozoides defeituosos na cauda do epidídimo (AKERLOF et al., 1989; MATSUOKA et al., 2006). A clusterina participa na proteção celular contra o estresse térmico e dano oxidativo, protegendo as células de elementos deletérios (WILSON; EASTERBROOK-SMITH, 2000). A clusterina expressa em condições de estresse celular se liga a proteínas parcialmente desestruturadas, solubilizando-as e protegendo as células dos efeitos tóxicos da precipitação proteica (HUMPHREYS et al., 1999; BAILEY et al., 1999). A clusterina apresenta interação com a lactoferrina que impede a produção de radicais livres, e consequentemente, evita danos à membrana espermática.

Duas proteínas pertencentes ao grupo das proteínas de choque térmico foram identificadas no FRT: HSP70 e HSC71 ou HSP70-8. As *Heat Shock Proteins* (HSPs) ou

proteínas do choque térmico exibem níveis elevados em resposta às condições de estresse osmótico ou oxidativo e, principalmente, de estresse térmico. Nestas condições adversas, as HSP auxiliam a síntese e maturação de novas proteínas que substituirão aquelas comprometidas pelo estresse (BUKAU; HORWICH, 1998). As HSPs fazem parte da família das proteínas conhecidas como chaperonas, denominadas assim por apresentarem a capacidade de interagir reversivelmente com outras proteínas auxiliando na formação, dobramento e transporte transmembrana (KARP, 2005). Em resposta ao estresse celular, as HSP70 atuam no dobramento de proteínas, orientando a renaturação e prevenindo a agregação proteica através da interação com as partes hidrofóbicas expostas da proteína alvo (MOSSER; MORIMOTO, 2004). O aumento de HSPs nas células lesadas também possui uma importante função na manutenção da viabilidade, uma vez que inibe a apoptose. Já foi mostrado que as HSP70 interagem diretamente com elementos da via apoptótica inibindo a cascata de eventos que culminam com a morte celular (MOSSER et al., 1997). Esta proteína também está envolvida em processos desde a formação dos gametas até a fertilização, desenvolvimento embrionário e gestação (MARIANI et al., 2000; BERRUTI & MARTEGANI, 2001; MATWEE et al., 2001; BROWNE et al., 2007).

A aldose redutase também atua na proteção do espermatozoide e está envolvida nos processos de desintoxicação de compostos aldeídos e carbonilas que são citotóxicos (TAKAHASHI et al., 1995), além de participar da via do polioliol no epidídimo (KOBAYASHI et al., 2002). Nesta via, a glicose é primeiramente reduzida a sorbitol pela aldose redutase e, posteriormente, o sorbitol é oxidado à frutose pela sorbitol desidrogenase (KINOSHITA; NISHIMURA, 1988). Em bovinos, ao longo do epidídimo, a aldose redutase está associada aos espermatozoides e a vesículas membranosas denominadas epididimosomas, favorecendo a acumulação de sorbitol no interior do fluido epididimal e, deste modo, contribuindo para a imobilização temporária dos espermatozoides durante o trânsito epididimário (FRENETTE et al., 2004). Nos testículos, a aldose redutase tem sido detectada em células de Sertoli e espermátides alongadas, onde está envolvida no processo de desintoxicação de compostos carbonila, como a 3-desoxiglicosona, causados por reações de glicação oriundas das concentrações elevadas de açúcares redutores. Essa molécula catalisa a redução dos metabólitos citotóxicos, tais como produtos da peroxidação lipídica e hormônios esteroides que são produzidos durante a espermatogênese (KOBAYASHI et al., 2002).

### 5.3 Proteínas associadas à motilidade espermática

Dois spots corresponderam a proteínas pertencentes à família de proteínas 14-3-3: 14-3-3 eta e 14-3-3 epsilon. A família de proteínas 14-3-3 inclui proteínas ácidas que possuem uma ampla distribuição nos tecidos de células eucarióticas (YAFFE, 2002). Essas proteínas são expressas nas células de Sertoli, espermátocitos, espermátides (PEREGO; BERRUTI, 1997; BERRUTI, 2000; CHAPIN et al., 2001), e em espermatozoides maduros no epidídimo (HUANG et al., 2004). Tais proteínas estão envolvidas numa variedade de atividades celulares, tais como transcrição, síntese de proteínas, interação com fosfoproteínas, vias metabólicas, ciclo celular, sinalização celular, organização do citoesqueleto e transporte celular (DOUGHERTY; MORRISON, 2004; JIN et al., 2004; KJARLAND et al., 2006; SHIKANO et al., 2006). Estudos sugeriram que a PP1 $\gamma$  (proteína fosfatase 1, subunidade catalítica,  $\gamma$ -isoforma) e suas proteínas reguladoras desempenham um papel chave na motilidade dos espermatozoides (VIJAYARAGHAVAN et al., 1996; HUANG VIJAYARAGHAVAN, 2004). Esta enzima está localizada ao longo de todo o flagelo (HUANG et al., 2002) e um nível elevado da sua atividade catalítica pode suprimir a motilidade espermática. A proteína 14-3-3 é uma proteína de ligação a PP1 $\gamma$ 2 que atua na preservação da PP1 $\gamma$ 2 fosforilada, mantendo, desta forma, a baixa atividade catalítica dessa enzima, assim evitando danos à motilidade (HUANG; VIJAYARAGHAVAN, 2004).

A tubulina está presente nos espermátocitos e espermátides de mamíferos (MORENO; SCHATTEEN, 2000; KIERSZENBAUM, 2002; KATO et al., 2004) e também em espermatozoides maduros (DRABER et al., 1991; DVORAKOVA et al., 2001; PEKNICOVA et al., 2001). Essa proteína celular identificada no fluido da *rete testis*, bem como a beta actina e os filamentos de actina, provavelmente, é oriunda da fragmentação de células espermáticas defeituosas em processos como a apoptose. As tubulinas regulam a reorganização intracelular das células germinativas durante a espermatogênese, um processo essencial para a fertilidade normal (KIERSZENBAUM et al., 2011). Também apresentam papel importante em termos de funcionalidade do esperma, já que estão associadas com a regulação da motilidade (GARNHAM; ROLL-MECAK, 2012). Em estudos realizados por Peknicova et al. (2007), foi constatado que a tubulina é uma proteína estrutural do flagelo e sua expressão diminui em amostras astenozoospermicas. Pesquisas recentes indicam que a

tubulina pode estar diretamente relacionada às modificações estruturais durante a capacitação e a reação acrossômica (DVORAKOVA et al., 2005; FRANCOU, 2014).

#### 5.4 Proteínas associadas à capacitação espermática

A beta actina (ACTB) é uma isoforma da actina que está ligada ao citoesqueleto, desempenhando funções na migração e morfologia celular, estando associada à motilidade, endocitose, divisão e adesão celular (BRAKEBUSCH; FASSLER, 2003; ENGQVIST-GOLDSTEIN; DRUBIN, 2003; ASCOUGH, 2004). ACTB é expressa no espermatozoide e está distribuída nas regiões acrossomal e pós acrossomal de espermatozoides ejaculados onde se envolve potencialmente na alteração da membrana durante a reação acrossômica (CASALE et al., 1988). Castellani-Ceresa et al. (1993) mostraram que a polimerização da actina, durante a reação acrossômica e a capacitação, é importante para o processo de fertilização. A actina pode ser encontrada dentro da célula na forma polimérica ou fibrosa (F-actina). A F-actina *capping* proteína atua na regulação da polimerização dos filamentos de actina, portanto, é importante para a regulação do comprimento e número dos filamentos durante o movimento intracelular (WEEDS; MACIVER, 1993). A F-actina consiste em um filamento de actina que serve como suporte estrutural e está envolvida em diversos eventos, como endocitose, fagocitose e movimento celular (VOGL, 1989). Em vários tipos de células, uma rede de F-actina constitui uma barreira física que regula a exocitose (AUNIS; BADER, 1988; NORMAN et al., 1994). E esta molécula tem sido relacionada com os processos de reação acrossômica e capacitação espermática em suínos, touros, carneiros, ratos e humanos (MORENO-FIERROS et al., 1992; DY, et al., 1999; BRENER, et al, 2003).

A endoplasmina é uma proteína de ligação ao cálcio do retículo endoplasmático que potencializa a capacidade de armazenamento do cálcio no retículo endoplasmático contribuindo, assim, para o fornecimento de cálcio necessário para a sinalização intracelular (KOCH et al., 1986). Essa proteína é também conhecida como *Heat shock protein 90 kDa beta member 1* (HSP90B1) e tem sido identificada em espermatozoides de humanos e ratos, participando nos eventos de sinalização associados à capacitação (ECROYD et al., 2003a; FICARRO et al., 2003; WALSH et al., 2008). A capacitação compreende alterações moleculares e bioquímicas pelas quais os espermatozoides passam antes de adquirir a capacidade de fertilizar o óvulo e a fosforilação de proteínas espermáticas em resíduos de



tirosina foi reconhecida como um componente importante desse processo. A HSP90B1 é uma das principais proteínas fosforilada em resíduos de tirosina que parece estar presente na superfície do espermatozoide durante a capacitação. A ativação de chaperonas ligadas à superfície espermática através da fosforilação de tirosina durante a capacitação pode ocasionar mudanças conformacionais que facilitam o reconhecimento da zona pelúcida (ASQUITH et al., 2004).

A RhoGDI $\alpha$  (*Rho GDP-dissociation inhibitor 1*) pertencente à família das proteínas Rho, também foi detectada no estudo. As proteínas da família Rho participam da transcrição gênica, progressão ciclo celular, dinâmica de microtúbulos, endocitose e exocitose. Elas também são reguladores fundamentais do citoesqueleto de actina de vários tipos celulares (ETIENNE-MANNEVILLE et al., 2002). A proteína Rho-GDI $\alpha$  está localizada no acrossoma e flagelo de espermatozoides de bovinos, ovinos, ratos e humanos (DUCUMMON; BERGER, 2006). Em estudos realizados por Shi et al. (2011), a Rho-GDI $\alpha$  teve uma expressão reduzida no acrossoma após a capacitação, desaparecendo após a reação acrossômica. Foram também constatados níveis reduzidos dessa proteína em espermatozoides oriundos de homens que apresentavam baixa fertilidade. Dessa forma, ela pode estar envolvida na capacitação e reação acrossômica. Togawa et al. (1999), constataram que camundongos que não expressavam Rho-GDI $\alpha$  apresentavam infertilidade, espermatogênese comprometida e degeneração dos túbulos seminíferos.

## 5.5 Proteases e inibidores

As serpinas (*serine protease inhibitors*- SERPIN) estão envolvidas em processos proteolíticos, tais como a coagulação do sangue, apoptose, fibrinólise, inflamação e ativação do sistema do complemento (PATTERSON, 1991), além de desempenharem um papel na inibição do crescimento celular in vivo (YAO et al., 2000). A serpina A3, detectada no presente estudo, é um membro da superfamília das serpinas e atua principalmente na inibição da tripsina, elastase e quimotripsina.

Outra serpina presente no fluido da *rete testis* de ovinos Morada Nova foi identificada como alfa-1-antiproteínase, também conhecida por  $\alpha_1$ -antitripsina. Esta proteína é o principal inibidor de serina-proteases no sangue e possui uma larga especificidade para serina-proteases, mas o principal alvo fisiológico parece ser a elastase neutrofílica

(PATTERSON, 1991). A  $\alpha_1$ -antiproteínase possui uma função protetora local contra a degradação proteolítica dos tecidos do trato reprodutivo masculino e exerce inativação da elastase em sítios inflamatórios. A elastase é uma protease produzida por leucócitos no trato genital masculino e está relacionada com a degradação dos espermatozoides e inibição da motilidade espermática. Assim, a  $\alpha_1$ -antiproteínase pode impedir os efeitos prejudiciais aos espermatozoides causados pela elastase (MORIYAMMA et al., 1998; LESSIG et al., 2010).

Detectou-se também, no presente estudo, spots correspondentes a proteínas que atuam no sistema ubiquitina-proteassoma. Este sistema compõe um mecanismo pós-traducional que a célula usa para o controle de proteínas que já foram sintetizadas, por meio do qual é possível degradar determinados peptídeos de acordo com diferentes estímulos. O processo de ubiquitinação é composto por uma cascata de três enzimas: as ativadoras da ubiquitina (E1), as conjugadoras de ubiquitina (E2) e as ubiquitina ligases (E3). As enzimas E1 e E2 são responsáveis por ativar e conjugar as moléculas de ubiquitina, respectivamente, enquanto as enzimas E3 são importantes para transferir as moléculas de ubiquitina da enzima E2 para o substrato reconhecido para degradação no proteassoma. Para haver o reconhecimento e a degradação da proteína alvo pelo proteassoma, esta deve ser poliubiquitinada com pelo menos quatro moléculas (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). As proteínas ubiquitina carboxi-terminal hidrolase isoenzima 1 (UCHL1) e ubiquitina carboxi-terminal hidrolase isoenzima 3 (UCHL3) estão envolvidas no processamento de precursores de ubiquitina e proteínas ubiquitinadas. Elas atuam na hidrólise de aminoácidos de ubiquitinas e clivam di-ubiquitinas (LARSEN et al., 1998). A ubiquitinação pode ser responsável pela eliminação de espermatozoides com defeitos durante o trânsito epididimário em humanos e bovinos de modo que, UCHL1 e UCHL3, ambas expressas em elevados níveis no epidídimo e testículos potencialmente regulam a qualidade espermática (BASKA, et al., 2008; SUTOVSKY, et al., 2004). Na espermatogênese, o sistema ubiquitina-proteassoma é necessário para a degradação de diversas proteínas durante a mitose, meiose e desenvolvimento pós-meiótico (WILKISON, 1997; BAARENDS et al., 1999; BAARENDS et al., 2000). A UCHL1 parece atuar na proliferação mitótica e a UCHL3, na diferenciação meiótica de espermátocitos à espermátides (KWON, 2004; KWON, 2007). O proteassoma, identificado no presente estudo, consiste de um complexo enzimático de proteases que degrada proteínas poliubiquitinadas em aminoácidos e pequenos peptídeos (GLICKMAN;

CIECHANOVER, 2002). Nos espermatozoides, os proteossomas foram localizados intracelularmente, principalmente associados com o acrossoma e a peça intermediária (WOJCIK et al., 2000; BIALY et al., 2001). Esse complexo está envolvido em determinadas etapas da fertilização, como a exocitose do acrossoma, possivelmente por degradar proteínas associadas com a membrana acrosomal externa, e fusão com a membrana plasmática do óvulo (MYKLES, 1998; SUTOVSKY ET AL., 2004).

A enzima E1 ativadora da NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein-8*) é uma proteína semelhante à ubiquitina que modifica as proteínas-alvo em uma reação semelhante à ubiquitinação. NEDD8 é essencial para mecanismos reguladores celulares e para a progressão do ciclo celular. Atua na regulação da atividade enzimática das E3 ubiquitina ligases as quais são necessárias para a ubiquitinação de várias proteínas e também são responsáveis por vários processos celulares, tais como transcrição, sinalização intracelular e desenvolvimento celular (WHITBY et al., 1998; TATEISHI et al., 2001).

A proteína transição retículo endoplasmático ATPase, também conhecida por VCP (*valosin-containing protein*), está relacionada com a regulação celular, controle da qualidade mitocondrial, mitose, fusão de membranas, e a via ubiquitina-proteassoma (ZALK; SHOSHAN-BARMATZ, 2003; ZHANG et al., 2000). A VCP está envolvida na degradação de substratos da via da ubiquitina-proteassoma, e parece ser um importante componente dessa via. Ela atua na proliferação de células do testículo e epidídimo de ratos (CAYLI et al., 2011).

A alfa-2-HS-glicoproteína (AHSG) ou fetuína-A é sintetizada principalmente no fígado e participa do transporte de ácidos graxos, osteogênese e reabsorção óssea. AHSG interage com a metaloproteinase de matriz-9 que também está envolvida na reabsorção óssea. Além disso, atua como inibidor de protease e promove a fagocitose de partículas estranhas e células apoptóticas (JERSMANN et al., 2003; MORI et al., 2011). O sêmen tratado com anticorpos anti-AHSG afeta adversamente a motilidade espermática (PILLAI et al., 1998). Esta proteína também foi detectada associada à membrana de espermatozoides ejaculados de carneiros Morada Nova. A ligação desta molécula com as membranas celulares é mediada por anexinas e ela provavelmente, otimiza a atividade zinco-metaloproteinase para garantir o funcionamento normal do espermatozoide (VAN TILBURG et al., 2013). A fetuina bovina foi descrita pela primeira vez em 1944 por Pedersen como a proteína mais abundante no soro

fetal bovino (PERDERSEN, 1944) e, de acordo com estudos realizados Park et al. (2012) com touros Hanwoo de alta e baixa fertilidade, a AHSG foi detectada de forma abundante em espermatozoides de touros de alta fertilidade, no entanto a atuação dessa proteína na fertilidade não foi elucidada.

## 5.6 Enzimas glicolíticas

A alfa-enolase é uma enzima glicolítica chave que catalisa a desidratação de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato e requer o íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ) para ser cataliticamente ativa (PANCHOLI, 2001). A enolase parece ser sintetizada durante a espermatogênese estando mais abundante em espermatozoides maduros e em corpos citoplasmáticos residuais de espermátides alongadas e localiza-se, principalmente, na cauda de espermatozoides maduros (GITLITS et al., 2000). Em espermatozoides ejaculados, esta enzima glicolítica é encontrada como enolase- $\alpha\alpha$  (ENO- $\alpha\alpha$ ), uma isoforma largamente distribuída em vários tecidos, e enolase-S (ENO-S), uma isoforma específica ligada ao espermatozoide (EDWARDS; GROOTEGOED, 1983; FORCE et al., 2002). Ambas isoformas parecem refletir aspectos opostos na qualidade da célula espermática: ENO- $\alpha\alpha$  está relacionada com espermatozoides anormais e/ou imaturos enquanto a ENO-S associa-se com espermatozoides desenvolvidos normalmente. Isoformas desta última (S1, S2, S3) podem ser importantes marcadores da maturação espermática, uma vez que a isoforma S2 é predominante em espermatozoides ejaculados, enquanto S1 e S3 estão presentes em espermatozoides imaturos (FORCE et al., 2002; FORCE et al., 2004). Em estudos recentes, a alfa enolase tem sido indicada como um marcador de fertilidade em touros da raça Hanwoo (PARK et al., 2012).

A enolase-fosfatase E1 é uma enzima que atua em vias metabólicas de produção e conversão energia (WANG et al., 2005) e é um componente da via de recuperação da metionina, a qual é responsável pela síntese de S-adenosilmetionina, precursor para a síntese de poliaminas (CHATTOPADHYAY et al., 2003). O maior grupo ativo de poliaminas no plasma seminal é composto por espermina e espermidina (STABENFELDT; EDQVIST, 1988). As poliaminas apresentam uma relação positiva com a motilidade de espermatozoides de carneiros (MELENDREZ et al., 1992), também acredita-se que o nível de espermina no plasma seminal apresenta alguma relação com a concentração espermática e atividade

antimicrobiana (SCHOLLUM et al., 1977; EWING; CHANG, 1986). Provavelmente uma redução na atividade da enolase-fosfatase poderia prejudicar a síntese das poliaminas.

### 5.7 Outras proteínas identificadas no fluido da *rete testis*

Outra das proteínas estruturais identificadas no presente estudo foi a plastina a qual integra uma família de proteínas que se ligam à actina e são expressas abundantemente nas células dos mamíferos (LIN et al., 1993). Em estudos recentes, detectou-se a expressão da plastina em exossomas do plasma seminal de suínos (PIEHL et al., 2013) e em epididimossomas de humanos (THIMON et al., 2008), no entanto seu papel nessas estruturas é desconhecido.

Proteínas associadas à resposta imunológica como C3, IgM e IgG1 foram identificadas no presente estudo. A imunoglobulina gama 1 foi uma das principais proteínas detectadas no fluido da *rete testis* apresentando 3,1% da intensidade total dos *spots* detectados nos géis. Estudos confirmam que a IgG entra na *rete testis*, e a maior parte é reabsorvida, principalmente pelos ductos eferentes, embora algumas imunoglobulinas se concentram no lúmen como consequência da reabsorção de fluidos pelos ductos (JOHNSON; SETCHELL, 1968; KOSKIMIES et al., 1971; KNEE et al., 2005). A imunoglobulina gama 1 interage com a proteína C3 que desempenha um papel central na ativação do sistema do complemento, e com a molécula de CD4, a qual regula a ativação das células T. Sua rede de interação apresenta basicamente interações com proteínas que atuam no sistema imunológico.

Foram detectadas também proteínas relacionadas ao transporte de oxigênio (hemoglobina subunidade beta); supressão de tumor (proteína TSSC1 e proteína semelhante ao fator de transcrição de zíper de leucina); metabolismo de aminoácidos (aminoacilase); degradação do RNA (pseudouridina-5'-monofosfatase); transporte de ácidos nucleicos e de proteínas através da membrana nuclear (proteína ativadora de Ran-GTPase); e transporte de cálcio e fosfato (alfa-S1-caseína).

## 6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo a identificar as proteínas do fluido da *rete testis* de carneiros da raça Morada Nova. Tais proteínas atuam principalmente em processos biológicos associados à regulação, processos celulares e resposta a estímulos, sendo que a maior parte delas apresentam funções de ligação, atividade catalítica e regulação enzimática.

O fluido da *rete testis* possui várias proteínas envolvidas na espermatogênese, o que representa um importante fator, uma vez que estas moléculas contribuem para o desenvolvimento das células germinativas, participando no transporte e conversão de substâncias requeridas para a produção dos gametas masculinos.

O significado funcional de outras proteínas presentes neste fluido ainda permanece desconhecido. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel destas proteínas sobre a função espermática.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; HOOD, L. E.; WATTS, J. D. Equipping scientists for the new biology. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 359, 2000.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 402, p. 198-207, 2003.

AGARWALL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive biology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 963-974, 2005.

AITKEN, R. J.; KELLY, R. W. Analysis of the direct effects of prostaglandins on human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 73, p. 139-146, 1985.

AITKEN, R. J. et al. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. **Journal of Andrology**, v. 10, p. 214-220, 1989.

AKERLÖF, E. et al. Serum factors stimulate the motility of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 12, p. 124-130, 1989.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 28, p. 1129-1136, 1983.

ALVAREZ, J. G. et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338-348, 1987.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 42, p. 585334-346, 1995.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. H. The epididymis and sperm maturation – a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5., p. 361-381, 1993.

AMANN, R. P. Physiology and endocrinology. *In*: Mc KINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea; Febiger, p. 658-688, 1993.

ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, v. 17, p. 443-453, 1996.

ASCOUGH, K.R. Endocytosis: Actin in the Driving Seat. **Current Biology**, v. 14, p. 124–126, 2004.

ASQUITH, K. L. et al. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 3645–3657, 2004.

AUNIS, D.; BADER, M. F. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. **Journal of Experimental Biology**, p. 139:253–266, 1988.

AURICH, J. E. et al. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 46, p. 791–797, 1996.

AX, R. L.; DICKSON K.; LENZ, R. W. Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to non return rates of dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 387–390, 1985.

AX, R. L.; LENZ, R. W. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1477, 1987.

BAARENDS W. M.; ROEST, H. P.; GROOTEGOED, J. A. The ubiquitin system in gametogenesis. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 151, p. 5–16, 1999.

BAARENDS, W. M.; van der LAAN, R.; GROOTEGOED J. A. Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. **Journal of Endocrinology Investigation**, Itália, v. 23, p. 597–604, 2000.

BAILEY, R. W. et al. Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ apoJ knock-out mice. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1042–1053, 2002.

BAINS, R. et al. Human sperm cells express CD44. **Fertility and Sterility**, Amsterdam, v. 78, p. 307–312, 2002.

BARRIER-BATTUT, I. et al. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. **Theriogenology**, v. 58, p. 229–232, 2002.

BARRIOS, B. et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531–1537, 2000.

BARRIOS, B. et al. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 27, p. 588–595, 2005.

BASKA, K. M. et al. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 215, p. 684–96, 2008.



BASS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility** , v. 68, p. 275-280, 1983.

BATHIA, V. N. et al. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 9819-9823, 2009.

BELLIN, M. E. et al. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 173-182, 1996.

BENOFF, S. et al. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. **Human Reproduction**, Oxford, v. 8, p. 2141-2154, 1993.

BERGERON, A. et al. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 71, p. 461–470, 2005.

BERRUTI, G. A novel rap1/B-Raf/14-3-3 theta protein complex is formed in vivo during the morphogenetic differentiation of postmeiotic male germ cells. **Experimental Cell Research**, v. 257, p. 172–179, 2000.

BERRUTI, G.; MARTEGANI, E. MSJ-1, a mouse testis-specific DnaJ protein, is highly expressed in haploid male germ cells and interacts with the testis-specific heat shock protein Hsp70-2. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 488-495, 2001.

BIALY, L. P. et al. Localization of proteasomal antigen in human spermatozoa: Immunohistochemical electron microscopic study. **Folia Histochemica Cytobiologica**, v. 40, p. 169–170, 2001.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnology**, v. 17, p. 121-127, 1999.

BLASCHUK, O.; BURDZY K.; FRITZ, I. B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 7714-7720, 1983.

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

BRAKEBUSCH, C.; FÄSSLER R. The integrin–actin connection, an eternal love affair. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 2324–2333, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Defesa e Inspeção Agropecuária. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. São Paulo: Inspetoria do SIPAMA, 2008.

BRAUNDMEIER, A.G., MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, p. 1915-1925, 2001.

BRENER, E. et al. Remodeling of the Actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 837–845, 2003.

BROWNE, C. L. et al. Extracellular heat shock protein 70 has novel functional effects on sea urchin eggs and coelomocytes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 1275-1287, 2007.

BUKAU, B.; HORWICH, A. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, p. 351-366, 1998.

BUSTOS-OBREGON, E.; HOLSTEIN, A. F. The rete testis in man: ultrastructural aspects. **Cell Tissue Research**, v. 175, p. 1–15, 1976.

CABALLERO, I. et al. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 505-513, 2009.

CALVETE, J. J. et al. Glycosylated boar spermadhesin AWN–1 isoforms. Biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites and effect of glycosylation on ligand binding. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, p. 667–673, 1994.

CALVETE, J. J. et al. Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. **Biological Chemistry**, v. 377, p. 521-527, 1996.

CALVETE, J. J. et al. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 407, p. 201–6, 1997.

CALVETE, J. J. et al. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemistry Journal**, v. 310, p. 615-622, 1995.

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, p. 1293-1301, 1997.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin localization in the holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 454-460, 1999.

- CANS, C. et al. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 13892–13897, 2003.
- CARDOZO, J. A et al. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, p. 841-850, 2006.
- CARLETTI, E. et al. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 48-57, 2008.
- CASALE, A. et al. Characterization of actin isoforms in ejaculated boar spermatozoa. **Gamete Research**, v. 20, p. 133–144, 1988.
- CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist**, London, v. 2, p. 49, 2002.
- CASTELLANI-CERESA, L. et al. Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 203–211, 1993.
- CEVIK M. et al. Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 31, p. 381–387, 2007.
- CHANDONNET, I. et al. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 313–318, 1990.
- CHAPIN, R.E. et al. Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1030–1052, 2001.
- CHATTOPADHYAY, M. K.; TABOR, C. W.; TABOR, H. Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, USA, p. 13869–13874, 2003.
- CICHY, J.; PURÉ, E. The liberation of CD44. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 161, p. 839-843, 2003.
- COOPER, T. G.; WAITES, G. M. H. Steroid entry into rete testis fluid and the blood-testis barrier. **Journal of Endocrinology**, Schaumburg, v. 65, p. 195–205, 1975.
- CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997.

DACHEUX, J.L. et al. Mammalian epididymal proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 306, p. 45-50, 2009.

DADOUNE, J; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. *In*: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, p. 227-255, 1993.

D'CRUZ, O. J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 1, p. 161-176, 1996.

DENHARDT, D.T.; GIACHELLI, C.M.; RITTLING, S. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annual Reviews on Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 41, p. 723-749, 2001.

DENHARDT, D.T. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas. **Calcified Tissue International**, New York, v. 74, p. 213-219, 2004.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interaction with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10149-10155, 1992.

DIDOLKAR, A. K.; ROYCHOWDHURY, D. Effect of prostaglandins A-1, E-2 and F-2 alpha on spermatogenesis in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, p. 275-278, 1980.

DHAMI, A.J.; SAHNI, K. L. Comparative assessment of certain biochemical and mineral constituents of seminal plasma and their interrelationships in ox and buffalo bulls. **UAR**, v. 14, p. 98-100, 1993.

DOSTALOVA, Z. et al. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**, v. 375, p. 457-461, 1994.

DOTT, H. M.; DINGLE, J. T. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. **Experimental Cell Research**, v. 52, p. 523-540, 1968.

DOTT, H. M.; HARRISON R. A. P.; FOSTER, G. C. A. The maintenance of motility and the surfaces properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 113-124, 1979.

DOUGHERTY M. K.; MORRISON, D. K. Unlocking the code of 14-3-3. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 1875-1884, 2004.

DE SILVA et al. Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. **Biochemistry**, v.29, p.5380–5389, 1990.

DE SOUZA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. A análise de proteomas: o despertar da era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, p. 12-14, 2003.

DRABER, P. et al. Immunostaining of human spermatozoa with tubulin domain-specific monoclonal antibodies. Recognition of a unique beta-tubulin epitope in the sperm head. **Histochemistry**, v. 95, p. 519–524, 1991.

DUCUMMON, C. C.; BERGER, T. Localization of the Rho GTPases and some Rho effector proteins in the sperm of several mammalian species. **Zygote**, Inglaterra, v. 14, p. 249-57, 2006.

DVORAKOVA, K. et al. Changes in immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins in boar spermatozoa after the AR induced by specific cytoskeletal inhibitors. **Folia Biologica**, v. 47, p. 18–27, 2001.

DYM, M. The mammalian testis-a morphological examination. **The Anatomical Record**, v. 86, p. 493–524, 1976.

ECROYD, H.; JONES, R. C.; AITKEN, R. J. Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1801-1807, 2003a.

ENGQVIST-GOLDSTEIN, A. E. Y.; DRUBIN, D.G. Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, p. 287-332, 2003.

ERIKSON, D.W. et al. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, Bristol, v. 133, p. 909-917, 2007.

ERMILOVA, I. P. et al. Protection by dietary zinc in ALS mutant G93A SOD transgenic mice. **Neuroscience Letters**, v. 379, p. 42-46, 2005.

ESCH F. S. et al. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 113, p. 861-867, 1983.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, p. 629-635, 2002.

ESKILD, W.; HANSSON, V. Vitamin A functions in the reproductive organs. *In: Vitamin A in Health and Disease*. Ed. R Blomhoff. Marcel Dekker Inc., New York. p. 531-559, 1994.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras**. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, p. 1-6, 19-32, 1990.

EWING, L. L.; CHANG, T. S. K. Physiology of male reproduction. *In*: WALSH, P. C.; GITTES, R. F.; PERLMUTIER, A. O. et al. **Campbell's urology**. Philadelphia, W. B. Saunders, p. 200-74, 1986.

FICARRO, S. et al. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosincontaining protein/p97 during capacitation. **Journal of Biology Chemistry**, v. 278, p. 11579-11589, 2003.

FLOHÉ; HARRIS Peroxiredoxin Systems. [S.l.] **Springer**, v. 44, 2007.

FORCE, A. et al. Enolase isoforms activities in spermatozoa from men with normospermia and abnormospermia. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 23, p. 202-210, 2002.

FORCE, A. et al. Electrophoretic Characterization of the human sperm-specific enolase at different stages of maturation. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 25, p. 824-829, 2004.

FOUCHÉCOURT, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. Glutathione-independent prostaglandin D<sub>2</sub> synthase in ram and stallion epididymal fluids: origin and regulation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 60, p. 558-566, 1999.

FOUCHÉCOURT, S. et al. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1790-1803, 2000.

FOUCHÉCOURT, S. et al. Mammalian lipocalin-type prostaglandin D<sub>2</sub> synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 458-467, 2002.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. *In*: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA. **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, p. 197-219, 1998.

FRANCOU, M. M. et al. Capacitation and acrosome reaction changes  $\alpha$ -tubulin immunodistribution in human spermatozoa. **Reproductive BioMedicine**, v. 28, p. 246-250, 2014.

FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Polyol pathway along the bovine epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 448-56, 2004.

FRITZ, I. B.; BLASCHUK, O. W.; BURDZY, K. Properties of clusterin, a glycoprotein which elicits cell aggregation, and immunochemical determination of levels in ovine tissues. *In*: **Symposium on Gonadal Peptides**, Philadelphia, 1985.

GABLER, C.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the estrous cycle. **Reproduction**, Bristol, v. 126, p. 721-729, 2003.

GARNHAM, C. P.; ROLL-MECAK, A. The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. **Cytoskeleton**, v. 69, p. 442–463, 2012.

GARNER, D. L. et al. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 56, p. 31–40, 2001.

GERENA, R. L. et al. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 826-833, 1998.

GERENA, R. L. et al. Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in adult murine testis and epididymis. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 848-854, 2000.

GEROZISSIS, P. et al. Origin of prostaglandins in human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 65, p. 401-404, 1982.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 373-428, 2002.

GITLITS, V.M. et al. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. **European Journal of Cell Biology**, Amsterdam, v.79, p.104-111, 2000.

GLISH, G.L.; VACHET, R.W. The basis of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature**, v. 2, p. 140-150, 2003.

GODFREY, R.W. et al. Effect of season and location on semen quality and serum concentrations of luteinizing hormone and testosterone in Brahman and Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 734-749, 1990.

GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alpha(V) and alpha(5)) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p. 468-474, 2007.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, p. 379-391, 1998.

GUILLAUME, E. et al. Cellular distribution of translationally controlled tumor protein in rat and human testes. **Proteomics**, v. 1, p. 880-889, 2001.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

HAMAMAH, S.; GATTI, J. L. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, p. 20–30, 1998.

- HANSSON, V. et al. Secretion and role of androgen binding proteins in the testis and epididymis. **Journal Reproduction and Fertility**, p. 17-33, 1976.
- HARGROVE, J. L.; MACINDOE, J. H.; ELLIS, L. C. Testicular contractile cells and sperm transport. **Fertility and Sterility**, v. 28, p. 1146-1157, 1977.
- HARTREE, E. F.; SRIVASTAVA, P. N. Chemical composition of the acrosomes of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 9, p. 47, 1965.
- HAYNES, P. A.; YATES, J. R. Proteome profiling-pitfalls and progress. **Yeast**, v. 17, p. 81-87, 2000.
- HIRAI, T. et al. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D on testicular morphology and gene expression in experimental cryptorchid mouse: testis specific cDNA microarray analysis and potential implication in male infertility. **Journal of Urology**, v.181, p. 1487-92, 2009.
- HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 237-241, 1985.
- HOWES, E. A. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 673-681, 1998.
- HUANG, Z. et al. Sperm PP1  $\gamma$  2 is regulated by a homologue of the yeast protein phosphatase binding protein sds22. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1936-1942, 2002.
- HUANG, Z.; VIJAYARAGHAVAN, S. Increased phosphorylation of a distinct subcellular pool of protein phosphatase, PP1  $\gamma$  2, during epididymal sperm maturation. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 439-447, 2004.
- HUANG, Z. et al. Protein 14-3-3zeta binds to protein phosphatase PP1 $\gamma$ 2 in bovine epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 77-184, 2004.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.
- HULEIHEL, M.; LUNENFELD, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 259-268, 2004.
- HUMPHREYS, D.T. et al. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, p. 6875-6881, 1999.
- IBRAHIM, N.M. et al. Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 20, p. 230-240, 1999.



IWAMOTO T. et al. Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. **FEBS Letters**, v. 368, p. 420-424, 1995.

JERSMANN, H. P.; DRANSFIELD, I.; HART, S. P. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. **Clinical Science**, Inglaterra, v. 105, p. 273-280, 2003.

JOHNSON, M. H.; SETCHELL, B. P. Protein and immunoglobulin content of rete testis fluid of rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 403-406, 1968.

JIN, J. et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. **Current Biology**, v. 14, p. 1436-1450, 2004.

JOBIM, M. I. M. et al. Albumina e osteopontina - proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 296-305, 2002.

JOBIM, M. I. M. et al. BSP A1/A2 like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 63, p. 2053-2062, 2005.

JHON, K. et al. Levels of the retinoic acid synthesizing enzyme aldehyde dehydrogenase-1A2 are lower in testicular tissue from men with infertility. **Fertility and sterility**, USA, v. 101, p. 960-966, 2014.

JOHNSON, J. A. et al. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 105, p. 7-15, 1996.

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 340-352, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

KANAI, M.; RAZ, A.; GOODMAN, D.S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 47, p. 2025-2044, 1968.

KANG, S. W. et al. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 6297-6302, 1998.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-256, 2008.

- KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3ª Ed. Editora Manole, São Paulo, p. 832, 2005.
- KATO, A. et al. Delta-tubulin is a component of intercellular bridges and both the early and mature perinuclear rings during spermatogenesis. **Developmental Biology**, v. 269, p. 196–205, 2004.
- KERR J. B. et al. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. *In*: NEILL J. D. (ed). **Physiology of Reproduction**. Amsterdam, Academic Press, p. 829, 2006.
- KIERSZENBAUM, A. L. Sperm axoneme: a tale of tubulin posttranslation diversity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 1–3, 2002.
- KIERSZENBAUM, A. L. et al. Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. **Spermatogenesis**, v. 1, p. 221–230, 2011.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.
- KING, G. J. **Reproduction in Domesticated Animals**. Amsterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier Science publishers, 1993.
- KINOSHITA, J. H.; NISHIMURA, C. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. **Diabetes Metabolism Reviews**, v. 4, p. 323–337, 1988.
- KJAESTAD, H., ROPSTAD, E., BERG, K.A. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 299-303, 1993.
- KJARLAND, E.; KEEN, T. J.; KLEPPE R. Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 7, p. 217–223, 2006.
- KNEE, R. A. et al. Transport of IgG across the blood-luminal barrier of the male reproductive tract of the rat and the effect of estradiol administration on reabsorption of fluid and IgG by the epididymal ducts. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 688-694, 2005.
- KOBAYASHI, T. et al. Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 674–683, 2002.
- KOSKIMIES, A. I.; KORMANO, M.; LATHI, A. A difference in the immunoglobulin content of seminiferous tubule fluid and rete testis fluid of the rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 463–465, 1971.
- KOUBOVA, J. et al. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. **Proceedings of the National Academy Sciences, USA**, v. 103, p. 2472–2479, 2006.

- KOCH, G. et al. Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin. **Journal of Cell Science**, v. 86, p. 217-232, 1986.
- KOKHAN, I. V. Role of iron in bacterial infections and microelement immunity. **Mikrobiolohichnyi Zhurnal**, v. 72, p. 59-69, 2010.
- KORMANO, M. The rete testis. *In*: JOHNSON A. D.; GOMES, W. R. (eds.), **The Testis, Advances in Physiology, Biochemistry and Function**. New York: Academic Press, pp. 461-479, 1977.
- KUMAR, A; FAROOQ, A. Effect of oxytocin on the concentration of fructose in the accessory glands of mouse. **Life Sciences**, v. 55, p. 19-24, 1994.
- KWON, J. Developmental regulation of ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in Mice. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 515-521, 2004.
- KWON, J. The new function of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes as reciprocal modulators of germ cell apoptosis. **Experimental animals/Japanese Association for Laboratory Animal Science**, Japão, v. 56, p. 71-77, 2007.
- LARSEN, C. N.; KRANTZ, B. A.; WILKISON, K. D. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. **Biochemistry**, v. 37, p. 3358-3368, 1998.
- LAZARUS, C. J. et al. Immunohistochemical localization of microsomal PGE synthase-1 and cyclooxygenases in male mouse reproductive organs. **Endocrinology**, v. 143, p. 2410-2419, 2002.
- LÉGER, J. G.; MONTPETIT, M. L.; TENNISWOOD, M.P. Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. **Biochemical and Biophysical**, p. 196-203, 1987.
- LENZ, R. W. et al. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 683-685, 1983.
- LENZ, R. W. et al. Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glycosaminoglycans. **Gamete Research**, v. 8, p. 11, 1983.
- LENZ, R. W. et al. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1073, 1988.
- LESSIG, J.; ARNHOLD, J.; GLANDER, H. J. alpha1-antitrypsin prevents polymorphonuclear leucocyte-elastase effects on spermatozoa quality. **International Journal of Andrology**, v. 33, p. 64-72, 2010.
- LEWIS, S. E. et al. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 142-147. 1997.

LIN, C. S. et al. Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. **Journal Biological Chemistry**, v. 268, p. 2781–2792, 1993.

LIPPARD, S. J. Principles of Bioinorganic Chemistry. **University Science Books**, 1994.

LIU, D. Y. An important role of actin polymerization in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 941–949, 1999.

LIU, H. et al. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of Mcl-1 by TCTP, **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 3117–3126, 2005.

LOW, T.Y., SEOW, T.K., CHUNG, M.C. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, v. 2, p. 1229-1239, 2002.

LU, C. H. et al. Serpine2, a serine protease inhibitor extensively expressed in adult male mouse reproductive tissues, may serve as a murine sperm decapacitation factor. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 514-525, 2011.

LYU, P. Y.; HANDELSMAN, D. J. The present and the future state of hormonal treatment for male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 1, p. 9-23, 2003.

MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ageing Research Reviews**, v. 4, n. 2, p. 288-314, 2005.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M.R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reports**, New York, v. 7, p. 231-238, 1987.

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

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Studies on the metabolism of semen. 4. Aerobic and anaerobic utilization of fructose by spermatozoa and seminal vesicles. **Biochemical Journal Cambridge**, v. 43, p. 266–270. 1948.

MANN, T. **The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract**. 2nd ed. London, United Kingdom, Methuen, 1964.

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

MARIANI, M. L.; SOUTO, M.; FANELLI, M. A.; CIOCCA, D. R. Constitutive expression of heat shock proteins Hsp25 and Hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the

oestrus cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 217-223, 2000.

MARKS, J. L.; AX, R. L. Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. **Journal of Dairy Science**. v. 68, p. 2078-2082, 1985.

MASSÁNYI P. et al. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. **Journal of Andrology**, v. 5, p. 101–104, 2003.

MATSUOKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, Nagoya, v. 52, n. 5, p. 675-683, 2006.

MATWEE, C. et al. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 829-837, 2001.

MEISTER, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 9397-9400, 1994.

MELENDREZ, C. S. et al. Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 293-296, 1992.

MENEGAZ, D. et al. 1- $\alpha$ , 25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$  stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 119, p. 127–34, 2010.

MERI, S.; JARVA, H. Complement regulatory proteins. **Nature Encyclopedia of Life Sciences**, London, p. 1-7, 2001.

MERKE, J.; HUGEL, U.; RITZ, E. Nuclear testicular 1,25- dihydroxyvitamin D $_3$  receptors in Sertoli cells and seminiferous tubules of adult rodents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 127, p. 303–309, 1985.

METAFORA, S. et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, p. 121–131, 1989.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 42, p. 899–915, 1990.

MONACO, E. et al. Effect of osteopontin (OPN) on invitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 71, p. 450–457, 2009.

MORALES, C.; HERMO, L.; CLERMONT, Y. Endocytosis in epithelial cells lining the rete testis of the rat. **The Anatomical Record**, v. 209, p. 185-195, 1984.

MOREAU, R. et al. Type II domains of BSP-A1/A2 proteins:: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 148-154, 1998.

MORENO, R. D.; SCHATTEN, G. Microtubule configurations and posttranslational alpha-tubulin modification during mammalian spermatogenesis. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 46, p. 235–246, 2000.

MORENO-FIERROS, L. et al. F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33, p. 172–181, 1992.

MORI, K.; EMOTO, M.; INABA M. Fetuin-A: a multifunctional protein. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, Emirados Árabes Unidos, v. 5, p. 124-146, 2011.

MORYAMMA, A. et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) levels in seminal plasma: SLPI restores sperm motility reduced by elastase. **Molecular Human of Reproduction**, v. 4, p. 946– 950, 1998.

MOSSER, D. D. et al. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stressinduces apoptosis. **Molecular and Celular Biology**, v. 17, p. 5317-5327, 1997.

MOSSER, D. D.; MORIMOTO, R. I. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. **Oncogene**, v. 23, p. 2907-2918, 2004.

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

MOURA, A. A. et al. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 27, p. 201–211, 2006a.

MOURA, A. A. et al. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididimal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 74, p. 214–222, 2006b.

MOURA, A.A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, p. 169-188, 2007a.

MOURA, A. A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 169-188, 2007b.

MOURA, A. A. et al. Proteomic of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 2006-2020, 2010b.

MOURA, A. A. et al. Proteínas do plasma seminal, funções esperáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, p. 139-144, 2011.

MÜLLER, P. et al. Biophysical characterizations of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. **European Biophysics Journal**, v. 27, p. 33–41, 1998.

MYKLES, D. L. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems. **International Review of Cytology**, v. 184, p. 157–289, 1998.

NAGATA, A. Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionarily differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins. **Proceedings National Academy of Sciences, USA**, v. 88, p. 4020–4024, 1991.

NAPOLI, J. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. In: Moldave K, editor. **Progress in nucleic acid research and molecular biology**. San Diego: Academic Press, v. 63, p. 139–188, 2000.

NASS et al. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to caudal epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, n. 237, 1990.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. New York, 2002.

NORMAN, J. C. et al. Actin filament organization in activated mast cells is regulated by heterotrimeric and small gtp-binding proteins. **Journal of Cell Biology**, v. 126, p. 1005–1015, 1994.

NOY, N.; SLOSBERG, E.; SCARLATA, S. Interactions of retinol with binding proteins: studies with retinol-binding protein and with transthyretin. **Biochemistry**, v. 31, p. 11118–11124, 1992.

O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v. 22, p. 289-318, 2001.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OSMUNDTSEN, B. C. et al. Multiple sites of action of the vitamin D endocrine system: FISH stimulation of testis 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 34, p. 339–343, 1989.

PACHOLI, V. Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 902–920, 2001.

- PARK, Y. et al. Fertility-related proteomic profiling bull spermatozoa separated by percoll. **Journal of Proteome Research**, USA, v. 11, p. 4162–4168, 2012.
- PASQUALOTTO, F. F. et al. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. **Urology**, v. 55, p. 881-885, 2000.
- PATTERSON, S.D. Mammalian  $\alpha_1$ -antitrypsins: comparative biochemistry and genetics of the major plasma serpin, **Comparative biochemistry and physiology**, Inglaterra, p. 439–454, 1991.
- PEDERSEN, K. O. Fetuin, a new globulin isolated from serum. **Nature**, v. 154, p. 575, 1944.
- PEKNICOVA, J. et al. Differential subcellular distribution of tubulin epitopes in boar spermatozoa: recognition of class III b-tubulin epitope in sperm tail. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 672–679, 2001.
- PEREGO, L.; BERRUTI, G. Molecular cloning and tissue-specific expression of the mouse homologue of the rat brain 14-3-3 theta protein: characterization of its cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 370–379, 1997.
- PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 56, p. 425–434, 2001.
- PIEHL, L. L. Boar seminal plasma exosomes: effect on sperm function and protein identification by sequencing. **Theriogenology**, v. 79, p. 1071–1082, 2013.
- PILLAI, S.; RUST, P. F.; HOWARD, L. Effects of antibodies to transferrin and alpha 2-HS glycoprotein on in vitro sperm motion: implications in infertility associated with endometriosis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, p. 235–42, 1998.
- PILCH, B.; MANN, M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. **Genome Biology**, v. 7, p. 1-10, 2006.
- POLAKOSKI, K. L.; KOPTA, M. Seminal Plasma. *In*: ZANEVELD, L. J. D.; CHATTERTON, R. T. (org). **Biochemistry of mammalian reproduction**. Wiley Interscience Publicações, p. 89-117, 1982.
- POTER, S. B. et al. Localization of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein in the rat testis and epididymis. **Journal of Andrology**, v. 6, p. 197-212, 1985.
- ROCHA, T. L. et al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Comunicado Técnico 136, Brasília – DF 12p., 2005.



REGO et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Animal Reproduction Science*, v. 148, p. 1–17, 2014.

RODRIGUES, B. A.; DONÁ, A. V.; RODRIGUES, J. L. Influência da secreção prostática autóloga sobre a viabilidade dos espermatozoides caninos no pós-descongelamento. ***Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science***, v. 36, p. 316–323, 1999.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B. Assessment of sperm fertilizing ability in farm animals. ***Acta Agriculturae Scandinavica***, p.12-18 (Suppl. 29), 1998.

RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. Immunoelectroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa *in vitro* to the zona pellucid. ***Reproduction, Fertility and Development***, v. 10, p. 491-497, 1998.

RONCOLETTA, M. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. ***Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science***, v. 36, 1999.

ROSETE, P. G. et al. Óxido nítrico, una molécula multifuncional. ***Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mex.***, v. 12, p. 300-304, 1999.

ROOSEN-RUNGE, E. C.; HOLSTEIN, A. F. The human rete testis. ***Cell. Tissue Research***, v. 189, p. 409–433, 1978.

SANCHEZ-PARTIDA, L. G. et al. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. ***Journal of Andrology***, v. 20, p. 280–288, 1999.

SANZ, L. et al. The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. ***European Journal of Biochemistry***, Malden, v. 205, p. 645–652, 1992.

SCHOLLUM, L. M.; JARVIS, B. D. W.; BACON, D. F. Antimicrobial activity of bovine seminal plasma. ***New Zealand Journal of Agricultural Research***, v. 20, p. 283-290, 1977.

SENSIBAR, J. A. et al. Localization and molecular heterogeneity of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) among ventral prostate, seminal vesicle, testis and epididymis of rats. ***Biology of Reproduction***, Madison, v. 49, p. 233-242, 1993.

SETCHELL, B. P. et al. Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into the epididymis. ***Biology of Reproduction***, v. 1, p. 40–66, 1969.

SETCHELL B. P. Testicular blood supply, lymphatic drainage and secretion of fluid. *In*: JOHNSON A. D.; GOMES W. R.; VANDEMARK, N. L. (eds.), ***The Testis***. New York: Academic Press, p. 101-239, 1970.

SETCHELL, B. P.; BROOKS, D. E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract *In*: KNOBIL, E.; NEIL J. (eds). **The Physiology of Reproduction**. New York, Raven Press; p.753–836, 1988.

SEXTON, T. J.; AMANN, R. P.; FLIPSE, R. J. Free amino acids and protein in rete testis fluid, vas deferens plasma, accessory sex gland fluid and seminal plasma of the conscious bull. **Journal of Dairy Science**, v. 54, p. 412–416, 1971.

SHARMA, R. K. et al. The reactive oxygen species- total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, v. 14, p.2801-2807, 1999.

SHI, Z. H, et al. Expression of Rho-GDI alpha in human testes and sperm and its correlation with the success rate of IVF. **Zhonghua Nan Ke Xue**, China, v. 17, p. 325-329, 2011.

SHIKANO, S. et al. 14-3-3 Proteins: regulation of endoplasmic reticulum localization and surface expression of membrane proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 16, p. 370–375, 2006.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K. H.; BHARGAVA, P. J. **Proteins of seminal plasma**. New York, John Wiley and Sons, Inc., 1990.

SIITERI, J. E. et al. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 40, p. 16-28, 1995.

SIRAT, M. P. et al. Effects of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 45, p. 405–416, 1996.

SIUZDAK, G. **The expanding role of mass spectrometry in biotechnology**. San Diego, MCC press, 2006.

SKINNER, M. K. et al. Rete testis fluid (RTF) proteins: purification and characterization of RTF albumin. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 135-146, 1987.

SORENSEN, E.S.; PETERSEN, T.E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 198, p. 200-205, 1994.

SOUBEYRAND, S. et al. Purification of a novel phospholipase A2 from bovine seminal plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, p. 222-227, 1997.

SOUZA, C. E. et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 4436–4456, 2012.

STABENFELOT, G. H.; EOQVIST, L. Processos reprodutivos no macho. *In*: SWENSON, M. J. **DUKES - Fisiologia dos animais domésticos**. 10ed. Rio de Janeiro, Guanabara, p.719-730, 1988.

- STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature**, v. 5, p. 699-711, 2004.
- STREZEZEK, J. et al. Purification and partial characterization of a 5,700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 29, p. 5–52, 1992.
- STRZEZEK, J. et al. Proteomics of boar seminal plasma – current studies possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology**, v. 5, p. 279-290, 2005.
- SUTOVSKY, P. et al. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1625–1637, 2004.
- SUTOVSKY, P.; HAUSER, R.; SUTOVSKY, M. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. **Human Reproduction**, v. 19, p. 628–638, 2004.
- SYLVESTER, C. et al. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 195-207, 1991.
- SZKLARCZYK, D. et al. *Nucleic Acids Res.* 2011 39: D561 [PMID: 21045058]
- TAINER, J. A. et al. Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. **Journal of Molecular Biology**, v. 160, p. 181–217, 1982.
- TAKAHASHI M. et al. Elevation of aldose reductase gene expression in rat primary hepatoma and hepatoma cell lines: implication in detoxification of cytotoxic aldehydes. **International Journal of Cancer**, v. 15, p. 749–754, 1995.
- TATEISHI, K. et al. (2001). The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. **Journal of Cell Biology**, v. 155, p. 571–579, 2001.
- TEDESCHI, G. et al. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, Malden, v. 267, p. 6175–6179, 2000.
- TENNISWOOD, M. P. et al. Active cell death in hormone-dependent tissues. **Cancer Metastasis Reviews**, New York, v. 11, p. 197-220, 1992.
- THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 52, p. 1372-1379, 1995.
- THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, p. 1080-1088, 1997.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1080-1088, 1998.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768–776, 1999.

TOGAWA, A. et al. Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDI $\alpha$ . **Oncogene**, Inglaterra, v. 18, p. 5373-5380, 1999.

TÖPFER-PETERSEN, E. et al. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, Berlin, v. 30, p. 217–224, 1998.

TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. **Human Reproduction**, Oxford, v. 5, p. 314–329, 1999.

TÖPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 159–70, 2005.

THIMON, V. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. **Human Reproduction**, v. 23, p. 1698–1707, 2008.

TUMMARUK, P. et al. Reproductive performance of purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire sows: II, Effect of mating type, weaning-to-first service interval and lactation length. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 50, p. 217–224, 2000.

TUNG, P. S.; ROSENIOR, J.; FRITZ, I. B. Isolation and Culture of Ram Rete Testis Epithelial Cells: Structural and Biochemical Characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 1297–1312, 1987.

TUNG, P. S.; FRITZ, I. B. Immunolocalization of clusterin in the ram testis, rete testis, and excurrent ducts. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 177-186, 1985.

UHLAND, A. M.; KWIECINSKI, G. G.; DELUCA, H. F. Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D-deficient male rats. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 1338–1344, 1992.

URADE, Y.; WATANABE, K.; HAYASHI, O. Prostaglandin D, E and F synthases. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signaling**, Holanda, v. 12, p. 257–273, 1995.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN TILBURG et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, p. 1247–1261, 2013.

VAN TILBURG et al. Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3°S). **International Society of Biometeorology**, v. 3, 2014.

VERNET, N. et al. Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. **Endocrinology**, v. 147, p. 96–110, 2006.

VIEIRA, M.; SARAIVA, M. J. Transthyretin: a multifaceted protein. **Biomolecular Concepts**, Alemanha, v. 5, p. 45-54, 2014.

VIJAYARAGHAVAN, S. et al. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. **Biology of Reproduction**, v. 54, p.709–718, 1996.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 1, p. 39–50, 2003.

VISCONTI, P. E. et al. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 242-248, 1998.

VOGL, A. W. Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and sertoli cells. **International Review Cytology**, v. 119, p. 1–56, 1989.

VOGLMAYIR, J. K.; WAITES, G. M. H.; SETCHELL, B. P. Studies on spermatozoa and fluid collected directly from the testis of the conscious ram. **Nature**, London, v. 210, p. 861–863, 1966.

VOGLMAYIR, J. K.; LARSEN, L. H.; WHITE, I. G. Metabolism of spermatozoa and composition of fluid collected from the rete testis of living bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 21, p. 449–46, 1970.

WAITES, G. M. H. Fluid secretion. In: Johnson, A. D.; Cones, W. R. (eds.), **The Testis**, Vol. 4. New York: Academic Press, p. 91-123, 1977.

WAKABAYASHI, H. et al. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 955-957, 1999.

WALSH, A. et al. Identification of the molecular chaperone, heat shock protein 1 (Chaperonin 10), in the reproductive tract and in capacitating spermatozoa in the male mouse. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 983-993, 2008.

WANG, H. et al. Crystal structure of human E1 enzyme and its complex with a substrate analog reveals the mechanism of its phosphatase/enolase activity. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, p. 917–926, 2005.

WEEDS, A.; MACIVER, S. F-actin capping proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, v.5, p. 63-69, 1993.

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 61-65, 1996.

WILKINS, M. R. et al. **Proteome research: new frontiers in functional genomics**. Germany, Springer-Verlag, 1997.

WILKISON, K. D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. **FASEB Journal**, USA, v. 11, p. 1245–1256, 1997.

WILLIAMS, J. Proteins of iron storage and transport. **Elsevier**, Amsterdam, p. 13-23, 1985.

WILSON, M. R.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. **A Journal of the International Biometric Society**, Texas, v. 25, p. 95-98, 2000.

WITE, R. G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, ESE. **Reprodução animal**. 4a ed. São Paulo, Manole, p. 212-28, 1988.

WHITBY, F. G. et al. Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 34983–34991, 1998.

WOJCIK, C. et al. Proteasomes in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 23, p. 169–177, 2000.

WOLBACH, S. B.; HOWE, P. R. Tissue changes following deprivation of fat soluble A Vitamin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 42, p. 753–757, 1925.

WONG W. Y. et al. The impact of calcium, magnesium zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 131–136, 2001.

WU, C. J. et al. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 26962-26968, 2001.

WU, H. et al. Isoelectric Focusing Management: An Investigation for Salt Interference and an Algorithm for Optimization. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 5542-5556, 2010a.

YAFFE, M. B. How do 14-3-3 proteins work?—Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. **FEBS Letters**, v. 513, p. 53–57, 2002.

YAO, J.; BAECHER-ALLAN, C. M.; SHARON, J. Serpins identified as cell growth inhibitors in human plasma. **Molecular and Cellular Biology Research Communications**, USA, v. 3, p. 76–81, 2000.

ZALKR, R.; SHOSHAN-BARMATZ V. ATP binding sites in brain p97/VCP (valosin-containing protein), a multifunctional AAA ATPase. **Biochemical Journal**, v. 374, p. 473–480, 2003.

ZANG, W.; CHAIT, B.T. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 2482-2489, 2000.

ZHANG, H. et al. VCP, a weak ATPase involved in multiple cellular events, interacts physically with BRCA1 in the nucleus of living cells. **DNA and Cell Biology**, USA, v. 19, p. 253–263, 2000.

ZHANG, Y. et al. Prostaglandin E synthase is regulated in postnatal mouse testis. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, USA, v. 4, p. 1071-1080, 2012.

Tabela 1. Proteínas do fluido da *rete testis* de carneiros da raça Morada Nova identificadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) associada à espectrometria de massa (ESI-Q-Tof). Os spots numerados referem-se aos spots mostrados na figura 4.

Protein	Experimental <sup>1</sup> kDa/pI	NCBI nr accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z	z
<b>Serum albumin precursor</b>								
<b>Spot 1</b>	62.61/4.00	57164373	745	28	(89) K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup> (123) R.NECFLNHHKDDSPDLPK.L <sup>(138)</sup> (139) K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup> (139) K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup> (184) K.YNGVVFQECQAEDK.G <sup>(197)</sup> (184) K.YNGVVFQECQAEDK.G <sup>(197)</sup> (249) K.ADFTDVTK.I <sup>(256)</sup> (267) K.ECCHGDLLECADDR.A <sup>(280)</sup> (286) K.YICDHQDALSSK.L <sup>(346)</sup> (375) K.EYEATLEDCCA.K.E <sup>(386)</sup> (402) K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup> (421) K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup> (437) R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup> (437) R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup> (469) R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup> (548) K.KQTALVELLK.H <sup>(577)</sup> (569) K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	26 25 37 89 52 19 36 39 37 26 51 109 54 31 78	473.9036 643.6338 516.5988 774.3986 874.3632 874.8546 448.7241 583.8948 479.5549 744.8082 653.3554 752.3933 542.6468 813.4695 870.9267	3 3 3 2 2 2 2 3 3 2 2 2 3 2 2
<b>Spot 17</b>	65.00/5.57	57164373	633	21	(89) K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup> (161) K.YLYEVAR.R <sup>(167)</sup> (267) K.ECCHGDLLECADDR.A <sup>(280)</sup> (347) K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup> (375) K.EYEATLEDCCA.K.E <sup>(386)</sup>	53 38 39 54 52	710.3544 457.2440 583.8926 798.3971 744.8067	2 2 3 2 2



Spot 18	66.71/5.72	57164373	1280	39	<sup>(402)</sup> K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup>	32	653.3640	2
					<sup>(421)</sup> K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	100	752.3933	2
					<sup>(437)</sup> R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	59	542.6464	3
					<sup>(437)</sup> R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	24	813.4688	2
					<sup>(469)</sup> R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	101	870.9241	2
					<sup>(548)</sup> K.KQTALVELLK.H <sup>(557)</sup>	30	571.8633	2
					<sup>(569)</sup> K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	80	700.3537	2
					<sup>(569)</sup> K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	75	708.3519	2
					<sup>(89)</sup> K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	34	473.9028	3
					<sup>(89)</sup> K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	63	710.3547	2
					<sup>(106)</sup> R.ETYGDMADCCEK.Q <sup>(117)</sup>	48	739.7690	2
					<sup>(106)</sup> R.ETYGDMADCCEK.Q + Oxidation(M) <sup>(117)</sup>	32	747.7681	2
					<sup>(123)</sup> R.NECFLNHKDDSPDLPK.L <sup>(138)</sup>	32	643.6320	3
					<sup>(139)</sup> K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	90	774.3942	2
					<sup>(139)</sup> K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	48	516.5995	3
					<sup>(169)</sup> R.HPYFYAPELLYYANK.Y <sup>(183)</sup>	34	630.3156	3
					<sup>(184)</sup> K.YNGVFQECCQAEDK.G <sup>(197)</sup>	38	874.3625	2
					<sup>(249)</sup> K.ADFTDVTK.I <sup>(256)</sup>	36	448.7233	2
					<sup>(267)</sup> K.ECCHGDLLECADDR.A <sup>(280)</sup>	44	583.8933	3
					<sup>(286)</sup> K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	29	479.5547	3
					<sup>(286)</sup> K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	20	479.8840	3
					<sup>(347)</sup> K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	65	798.3961	2
					<sup>(360)</sup> R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	52	480.6099	3
					<sup>(375)</sup> K.EYEATLEDCCA.E <sup>(386)</sup>	56	744.8084	2
					<sup>(387)</sup> K.EDPHACYATVFDK.L <sup>(399)</sup>	17	518.2300	3
					<sup>(387)</sup> K.EDPHACYATVFDK.L <sup>(399)</sup>	69	776.8443	2
					<sup>(402)</sup> K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup>	50	653.3452	2
<sup>(402)</sup> K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup>	57	653.3452	2					
<sup>(421)</sup> K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	102	752.3964	2					

Spot 19	72.10/5.88	57164373	1571	53	<sup>(437)</sup> R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	37	542.6474	3
					<sup>(437)</sup> R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	106	813.4710	2
					<sup>(438)</sup> K.APQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	90	749.4218	2
					<sup>(469)</sup> R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	116	862.9280	2
					<sup>(469)</sup> R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	87	870.9239	2
					<sup>(499)</sup> K.CCTESLVNR.R <sup>(507)</sup>	69	569.7570	2
					<sup>(569)</sup> K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	92	700.3554	2
					<sup>(569)</sup> K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	74	708.3508	2
					<sup>(569)</sup> K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	47	708.8449	2
					<sup>(76)</sup> K.TCVADESHAGCDK.S <sup>(88)</sup>	24	483.8639	3
					<sup>(89)</sup> K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	58	710.3287	2
					<sup>(89)</sup> K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	38	473.8974	3
					<sup>(106)</sup> R.ETYGDMADCCEK.Q <sup>(117)</sup>	51	739.7717	2
					<sup>(106)</sup> R.ETYGDMADCCEK.Q + Oxidation(M) <sup>(117)</sup>	54	747.7673	2
					<sup>(106)</sup> R.ETYGDMADCCEKQEPER.N <sup>(122)</sup>	44	706.6133	3
					<sup>(123)</sup> R.NECFLNHKDDSPDLPK.L <sup>(138)</sup>	70	643.6308	3
					<sup>(139)</sup> K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	47	516.5880	3
					<sup>(139)</sup> K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	73	774.3852	2
					<sup>(184)</sup> K.YNGVFQECCQAEDK.G <sup>(197)</sup>	31	874.3645	2
					<sup>(249)</sup> K.ADFTDVTK.I <sup>(256)</sup>	39	448.7195	2
					<sup>(286)</sup> K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	22	479.5560	2
					<sup>(298)</sup> K.LKECCDKPVLEK.S <sup>(309)</sup>	24	506.9286	3
					<sup>(319)</sup> K.DAVPENLPPLTADFAEDKEVCK.N <sup>(340)</sup>	42	820.0684	3
					<sup>(347)</sup> K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	25	798.3958	2
					<sup>(347)</sup> K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	71	798.3958	2
					<sup>(347)</sup> K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	55	798.3965	2
					<sup>(347)</sup> K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	70	798.3967	2
					<sup>(347)</sup> K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	42	798.3981	2
					<sup>(360)</sup> R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	28	480.6100	3

(360) R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	51	480.6105	3
(375) K.EYEATLEDCCAK.E <sup>(386)</sup>	33	744.7917	2
(375) K.EYEATLEDCCAK.E <sup>(386)</sup>	49	744.8075	2
(387) K.EDPHACYATVFDK.L <sup>(399)</sup>	22	518.2308	3
(387) K.EDPHACYATVFDK.L <sup>(399)</sup>	62	776.8475	2
(402) K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup>	57	653.3232	2
(402) K.HLVDEPQNLIKK.N <sup>(413)</sup>	28	478.6079	3
(421) K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	106	752.3710	2
(421) K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	65	752.8865	2
(437) R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	66	813.4507	2
(437) R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	120	813.4508	2
(437) R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	70	542.6398	3
(438) K.APQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	61	749.4229	2
(469) R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	113	862.9255	3
(469) R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	90	863.4215	2
(469) R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	45	580.9494	3
(469) R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	100	870.9252	2
(469) R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	36	871.4168	2
(499) K.CCTESLVNR.R <sup>(507)</sup>	76	569.7553	2
(499) K.CCTESLVNR.R <sup>(507)</sup>	59	570.2473	2
(508) R.RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK.F <sup>(528)</sup>	56	640.0654	4
(508) R.RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK.F <sup>(528)</sup>	76	853.0862	3
(508) R.RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK.F <sup>(528)</sup>	33	853.4110	3
(529) K.FFTFHADICTLPDTEK.Q <sup>(544)</sup>	63	647.9754	3
(549) K.QTALVELLK.H <sup>(557)</sup>	40	507.8133	2
(569) K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	78	700.3416	2
(569) K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	45	700.8474	2
(569) K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	79	708.3282	2

Spot 20	74.52/5.96	57164373	1937	57	(581) K.CCAADDKEGCFVLEGPK.L <sup>(597)</sup>	46	977.9108	2
					(421) K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	29	752.3936	2
					(76) K.TCVADESHAGCDK.S <sup>(88)</sup>	58	483.8641	3
					(89) K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	37	473.9005	3
					(89) K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	55	710.3529	2
					(106) R.ETYGDMADCCEK.Q <sup>(117)</sup>	48	739.7703	2
					(123) R.NECFLNHKDDSPDLPK.L <sup>(138)</sup>	66	643.6326	3
					(139) K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	40	516.5962	3
					(139) K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	48	516.5971	3
					(139) K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	52	774.3992	2
					(168) R.RHPYFYAPELLYYANK.Y <sup>(183)</sup>	39	682.3431	3
					(169) R.HPYFYAPELLYYANK.Y <sup>(183)</sup>	40	630.3161	3
					(169) R.HPYFYAPELLYYANK.Y <sup>(183)</sup>	36	944.9737	2
					(184) K.YNGVFQECCQAEDK.G <sup>(197)</sup>	31	874.8422	2
					(249) K.ADFTDVTK.I <sup>(256)</sup>	39	448.7195	2
					(257) K.IVTDLTK.V <sup>(263)</sup>	38	395.2400	2
					(267) K.ECCHGDLLECADDR.A <sup>(280)</sup>	34	583.8948	3
					(286) K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	30	479.5543	3
					(286) K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	80	718.8313	2
					(319) K.DAVPENLPLTADFAEDKEVCK.N <sup>(340)</sup>	54	820.0681	3
					(347) K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	62	798.3952	2
					(347) K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	61	798.3962	2
					(347) K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	37	798.3969	2
					(347) K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	62	798.3969	2
					(347) K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	59	798.3972	2
					(360) R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	56	480.6054	3
					(360) R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	68	720.4140	2
					(361) R.HPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	63	642.3595	2
					(375) K.EYEATLEDCCAK.E <sup>(386)</sup>	29	744.8063	2
					(375) K.EYEATLEDCCAK.E <sup>(386)</sup>	60	744.8074	2
					(387) K.EDPHACYATVFDK.L <sup>(399)</sup>	28	518.2310	3

					(387)K.EDPHACYATVFDK.L <sup>(399)</sup>	60	776.8450	2
					(402)K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup>	56	653.3235	2
					(402)K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup>	18	653.8376	2
					(421)K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	96	752.3940	2
					(421)K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	72	752.8853	2
					(437)R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	120	813.4495	2
					(437)R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	70	542.6390	3
					(438)K.APQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	68	749.4226	2
					(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	37	575.6177	3
					(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	49	862.9296	2
					(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	102	862.9296	2
					(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	30	580.9504	2
					(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	108	870.9267	2
					(499)K.CCTESLVNR.R <sup>(507)</sup>	61	569.7553	2
					(508)R.RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK.F <sup>(528)</sup>	71	853.0814	3
					(508)R.RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK.F <sup>(528)</sup>	27	853.4128	3
					(529)K.FFTFHADICTLPDTEK.Q <sup>(544)</sup>	51	647.9747	3
					(548)K.KQTALVELLK.H <sup>(557)</sup>	65	571.8298	2
					(548)K.KQTALVELLK.H <sup>(557)</sup>	63	572.2373	2
					(549)K.QTALVELLK.H <sup>(557)</sup>	37	507.8101	2
					(569)K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	99	700.3497	2
					(569)K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	30	700.3550	2
					(569)K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	29	700.8472	2
					(569)K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	79	708.3204	2
					(581)K.CCAADDKEGCFVLEGPK.L <sup>(597)</sup>	93	977.9100	2
					(581)K.CCAADDKEGCFVLEGPK.L <sup>(597)</sup>	16	652.9474	3
					(588)K.EGCFVLEGPK.L <sup>(597)</sup>	77	568.2805	2
Spot 21	83.05/6.07	57164373	2170	56	(66)K.LVKELTEFAK.T <sup>(75)</sup>	58	589.3395	2
					(69)K.ELTEFAK.T <sup>(75)</sup>	38	419.4958	2

<sup>(69)</sup> K.ELTEFAK.T <sup>(75)</sup>	38	419.7445	2
<sup>(76)</sup> K.TCVADESHAGCDK.S <sup>(88)</sup>	58	483.8629	3
<sup>(76)</sup> K.TCVADESHAGCDK.S <sup>(88)</sup>	22	725.2955	2
<sup>(76)</sup> K.TCVADESHAGCDKSLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	81	713.3129	4
<sup>(89)</sup> K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	37	473.8963	3
<sup>(89)</sup> K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	64	710.3455	2
<sup>(106)</sup> R.ETYGDMADCCEK.Q <sup>(117)</sup>	60	739.7714	2
<sup>(106)</sup> R.ETYGDMADCCEK.Q + Oxidation(M) <sup>(117)</sup>	51	747.7669	2
<sup>(106)</sup> R.ETYGDMADCCEKQEPER.N + Oxidation(M) <sup>(122)</sup>	88	711.9444	3
<sup>(139)</sup> K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	85	774.3827	2
<sup>(139)</sup> K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	47	516.5987	3
<sup>(139)</sup> K.LKPEPDTLCAEFKADEK.K <sup>(155)</sup>	49	664.3337	3
<sup>(139)</sup> K.LKPEPDTLCAEFKADEK.K <sup>(155)</sup>	46	664.3337	3
<sup>(161)</sup> K.YLYEVAR.R <sup>(167)</sup>	26	457.2356	2
<sup>(168)</sup> R.RHPYFYAPELLYYANK.Y <sup>(183)</sup>	39	682.3419	3
<sup>(169)</sup> R.HPYFYAPELLYYANK.Y <sup>(183)</sup>	32	630.3163	3
<sup>(169)</sup> R.HPYFYAPELLYYANK.Y <sup>(183)</sup>	29	944.9746	2
<sup>(184)</sup> K.YNGVFQECCQAEDK.G <sup>(197)</sup>	31	874.8541	2
<sup>(233)</sup> R.ALKAWSVAR.L <sup>(241)</sup>	49	501.3028	2
<sup>(249)</sup> K.ADFTDVTK.I <sup>(256)</sup>	39	448.7091	2
<sup>(249)</sup> K.ADFTDVTKIVTDLTK.V <sup>(263)</sup>	35	556.3023	3
<sup>(286)</sup> K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	32	479.5370	3
<sup>(286)</sup> K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	77	718.8132	2
<sup>(286)</sup> K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	32	479.8792	3
<sup>(286)</sup> K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	23	479.8820	3
<sup>(286)</sup> K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	29	719.3233	2
<sup>(298)</sup> K.LKECCDKPVLEK.S <sup>(309)</sup>	31	506.9274	3
<sup>(347)</sup> K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	72	798.3947	2

(347)K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	34	798.3950	2
(347)K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	69	798.3950	2
(347)K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	54	798.3959	2
(347)K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	71	798.3965	2
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	54	480.6040	3
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	44	480.6080	3
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	55	480.6087	3
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	53	480.6093	3
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	28	480.6108	3
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	47	480.6114	3
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	73	720.4135	2
(361)R.HPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	57	642.3619	2
(402)K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup>	53	653.3641	2
(402)K.HLVDEPQNLIK.K.N <sup>(413)</sup>	56	717.4030	2
(402)K.HLVDEPQNLIK.K.N <sup>(413)</sup>	46	478.9299	3
(421)K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	102	752.3756	2
(421)K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	49	752.8857	2
(437)R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	120	813.4444	2
(437)R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	67	542.6406	3
(460)K.CCAKPESERMPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	27	947.7642	3
(460)K.CCAKPESERMPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	49	953.0950	3
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	39	575.6163	3
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	115	862.9238	2
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	70	862.9256	2
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	42	870.9190	2
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	96	870.9190	2
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	55	580.9487	3

					(483) R.LCVLHEK.T <sup>(489)</sup>	18	449.7455	2
					(483) R.LCVLHEKTPVSEK.V <sup>(495)</sup>	46	513.9436	3
					(499) K.CCTESLVNR.R <sup>(507)</sup>	66	569.7563	2
					(508) R.RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK.F <sup>(528)</sup>	66	853.0851	3
					(529) K.FFTFHADICTLPDTEK.Q <sup>(544)</sup>	33	647.9741	3
					(548) K.KQTALVELLK.H <sup>(557)</sup>	68	571.8416	2
					(549) K.QTALVELLK.H <sup>(577)</sup>	37	507.7946	2
					(549) K.QTALVELLK.H <sup>(577)</sup>	37	508.3073	2
					(549) K.QTALVELLK.H <sup>(577)</sup>	46	508.3079	2
					(562) K.ATDEQLKTVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	58	729.0339	3
					(562) K.ATDEQLKTVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	51	734.3665	3
					(569) K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	18	700.3486	2
					(569) K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	88	700.3486	2
					(569) K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	78	708.3485	2
					(588) K.EGCFVLEGP.K.L <sup>(597)</sup>	59	568.2817	2
Spot 23	68.84/6.62	57164373	1630	48	(89) K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	64	710.3427	2
					(89) K.SLHTLFGDELCK.V <sup>(100)</sup>	37	473.9014	3
					(106) R.ETYGDMADCCEK.Q <sup>(117)</sup>	45	739.7696	2
					(106) R.ETYGDMADCCEK.Q + Oxidation(M) <sup>(117)</sup>	43	747.7694	2
					(123) R.NECFLNHKDDSPDLPK.L <sup>(138)</sup>	43	643.6302	3
					(139) K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	85	774.3897	2
					(139) K.LKPEPDTLCAEFK.A <sup>(151)</sup>	47	516.5984	3
					(161) K.YLYEVARR.R <sup>(167)</sup>	29	457.2402	2
					(169) R.HPYFYAPELLYYANK.Y <sup>(183)</sup>	32	630.3147	3
					(184) K.YNGVFQECCQAEDK.G <sup>(197)</sup>	38	874.3625	2
					(249) K.ADFTDVTK.I <sup>(256)</sup>	39	448.7227	2
					(257) K.IVTDLTK.V <sup>(263)</sup>	30	395.2401	2
					(267) K.ECCHGDLLECADDR.A <sup>(280)</sup>	26	583.8951	3
					(286) K.YICDHQDALSSK.L <sup>(297)</sup>	49	479.5556	3



(347)K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	23	798.3959	2
(347)K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	54	798.3968	2
(347)K.DVFLGSFLYEYSR.R <sup>(359)</sup>	55	798.3970	2
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	54	480.6078	3
(360)R.RHPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	68	720.4145	2
(361)R.HPEYAVSVLLR.L <sup>(371)</sup>	68	642.3629	2
(375)K.EYEATLEDCCAK.E <sup>(386)</sup>	57	744.8074	2
(387)K.EDPHACYATVFDK.L <sup>(399)</sup>	70	776.8455	2
(402)K.HLVDEPQNLIK.K <sup>(412)</sup>	54	653.3306	2
(421)K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	102	752.3697	2
(421)K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	40	752.3934	2
(421)K.HGEYGFQNALIVR.Y <sup>(433)</sup>	40	752.8887	2
(437)R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	120	813.4448	2
(437)R.KAPQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	70	542.6445	3
(438)K.APQVSTPTLVEISR.S <sup>(451)</sup>	47	749.4223	2
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L <sup>(482)</sup>	117	862.9268	2
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	88	870.9253	2
(469)R.MPCTEDYLSLILNR.L + Oxidation(M) <sup>(482)</sup>	30	871.4181	2
(499)K.CCTESLVNR.R <sup>(507)</sup>	59	570.2483	2
(529)K.FFTFHADICTLPDTEK.Q <sup>(544)</sup>	29	647.9741	3
(548)K.KQTALVELLK.H <sup>(577)</sup>	65	571.8530	2
(549)K.QTALVELLK.H <sup>(577)</sup>	38	507.8135	2
(569)K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	16	700.3538	2
(569)K.TVMENFVAFVDK.C <sup>(580)</sup>	99	700.3538	2
(569)K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	79	708.3467	2
(569)K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation(M) <sup>(580)</sup>	27	708.8438	2
(581)K.CCAADDKEGCFVLEGPK.L <sup>(597)</sup>	69	977.9093	2
(581)K.CCAADDKEGCFVLEGPK.L <sup>(597)</sup>	43	978.4255	2
(588)K.EGCFVLEGPK.L <sup>(597)</sup>	43	568.2799	2

## Alpha-2-HS-glycoprotein precursor

Spot	Retention Time	Accession	Abundance	Charge	Sequence	Score	Mass	Count
Spot 2	57.53/4.59	57526674	331	28	(58)K.HTLNQIDSVK.V <sup>(67)</sup>	32	577.8156	2
					(104)R.QQTEHAVEGDCDIHVLK.Q <sup>(120)</sup>	20	660.3159	3
					(121)K.QDGQFSVLFTK.C <sup>(131)</sup>	87	635.3300	2
					(188)R.AQFVPLPGSVSVEFAVAATDCIAK.E <sup>(211)</sup>	17	1238.6540	2
					(188)R.AQFVPLPGSVSVEFAVAATDCIAK.E <sup>(211)</sup>	34	826.4272	3
					(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	68	702.0061	3
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	90	675.6800	3
					(18)R.SIPLDPIAGYK.E <sup>(28)</sup>	37	587.3313	2
					(104)R.QQTEHAVEGDCDIHVLK.Q <sup>(120)</sup>	24	495.4872	4
					(104)R.QQTEHAVEGDCDIHVLK.Q <sup>(120)</sup>	18	660.3143	3
Spot 3	57.14/4.66	57526674	316	21	(121)K.QDGQFSVLFTK.C <sup>(131)</sup>	72	635.2968	2
					(121)K.QDGQFSVLFTK.C <sup>(131)</sup>	28	635.8236	2
					(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	68	701.9974	3
					(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	59	702.0103	3
					(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	25	702.0118	3
					(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	50	702.0119	3
					(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	85	1052.5210	2
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	98	1013.0340	2
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	86	675.6967	3
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	40	676.0165	3
					(18)R.SIPLDPIAGYKEPACDDPDTEQAALAAVDYINK.H <sup>(50)</sup>	23	1187.5814	3
					(58)K.HTLNQIDSVK.V <sup>(67)</sup>	51	577.8138	2
					Spot 4	56.67/4.73	57526674	325
(121)K.QDGQFSVLFTK.C <sup>(131)</sup>	74	635.3270	2					
(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	38	702.0102	3					

					(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	68	702.0158	3	
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	90	675.6711	3	
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	25	675.6963	3	
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	41	1013.046	2	
						2			
<b>Spot 5</b>	56.21/4.80	57526674	268	20	(121)K.QDGQFSVLFTK.C <sup>(131)</sup>	70	635.3211	2	
					(121)K.QDGQFSVLFTK.C <sup>(131)</sup>	29	635.8227	2	
					(188)R.AQFVPLPGSVSVEFAVAATDCIAK.E <sup>(21)</sup>	31	826.4344	3	
					(318)R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T <sup>(338)</sup>	76	702.0158	3	
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	90	675.6709	3	
					(339)K.TPIVGQPSVPGGPVHLC PGR.I <sup>(358)</sup>	33	676.0246	3	
<hr/>									
<b>Alpha-1-antiproteinase precursor</b>									
<b>Spot 6</b>	56.45/4.98	57526646	302	14	(148)K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	42	589.8214	2	
					(164)K.AFSINFR.D <sup>(170)</sup>	47	427.7310	2	
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	25	659.3262	2	
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	24	439.8874	3	
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	52	659.3278	2	
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	69	659.3294	2	
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	52	659.8215	2	
					(302)K.YASSANLHLPK.L <sup>(312)</sup>	37	600.8257	2	
					(313)K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	45	584.8059	2	
					(323)K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	63	536.3043	2	
					(323)K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	63	536.8120	2	
<b>Spot 7</b>	55.86/5.06	57526646	674	34	(48)K.IAPNLANFAFSIYHK.L <sup>(62)</sup>	25	569.3077	3	
					(148)K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	49	589.8044	2	
					(148)K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	16	589.8179	2	
					(148)K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	32	589.8232	2	
					(148)K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	30	589.8233	2	
					(148)K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	36	589.8234	2	
					(164)K.AFSINFR.D <sup>(170)</sup>	47	427.7289	2	

Spot 8

57526646

762

32

(214)	K.GKWEKPFVEHTTER.D <sup>(228)</sup>	62	468.9861	4
(229)	R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	61	659.3024	2
(229)	R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	20	439.8860	3
(229)	R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	49	659.3287	2
(229)	R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	24	659.8191	2
(229)	R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	49	659.8207	2
(246)	R.LGMFDLHYCDK.L + Oxidation(M) <sup>(256)</sup>	23	472.2089	3
(246)	R.LGMFDLHYCDK.L + Oxidation(M) <sup>(256)</sup>	78	707.8144	2
(282)	K.LQQLEDKLNELLAK.F <sup>(296)</sup>	23	590.3336	3
(289)	K.LNELLAK.F <sup>(296)</sup>	35	457.7693	2
(301)	K.KYASSANLHLPK.L <sup>(312)</sup>	38	443.5813	2
(302)	K.YASSANLHLPK.L <sup>(312)</sup>	42	600.8219	2
(313)	K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	19	584.7864	2
(313)	K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	62	584.8111	2
(313)	K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	53	584.8116	2
(313)	K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	58	584.8120	2
(323)	K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	36	536.3038	2
(323)	K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	54	536.3084	2
(323)	K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	36	536.8113	2
(323)	K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	54	536.8123	2
(333)	R.VFSNGADLSGITEEQPLMVSK.A <sup>(353)</sup>	53	1112.054	2
			2	
(333)	R.VFSNGADLSGITEEQPLMVSK.A + Oxidation (M) <sup>(353)</sup>	46	1119.563	2
			8	
(358)	K.AALTIDEK.G <sup>(365)</sup>	46	430.7404	2
(48)	K.IAPNLANFAFSIYHK.L <sup>(62)</sup>	40	569.3015	3
(148)	K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	45	589.8221	2
(148)	K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	46	589.8230	2
(164)	K.AFSINFR.D <sup>(170)</sup>	50	427.7299	2
(214)	K.GKWEKPFVEHTTER.D <sup>(228)</sup>	71	468.9805	4
(214)	K.GKWEKPFVEHTTER.D <sup>(228)</sup>	58	624.9758	3

					(216)K.WEKPFEVEHTTER.D <sup>(228)</sup>	57	422.7059	4
					(216)K.WEKPFEVEHTTER.D <sup>(228)</sup>	46	563.2745	3
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	52	658.7731	2
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	59	659.3218	2
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	52	659.3262	2
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	20	659.3267	2
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	20	659.8126	2
					(229)R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	52	659.8236	2
					(246)R.LGMFDLHYCDK.L <sup>(256)</sup>	43	466.8779	3
					(246)R.LGMFDLHYCDK.L <sup>(256)</sup>	61	699.8176	2
					(246)R.LGMFDLHYCDK.L + Oxidation(M) <sup>(256)</sup>	39	472.2081	3
					(246)R.LGMFDLHYCDK.L + Oxidation(M) <sup>(256)</sup>	60	707.8149	2
					(282)K.LQQLEDKLNELLAK.F <sup>(296)</sup>	32	590.3334	3
					(282)K.LQQLEDKLNELLAK.F <sup>(296)</sup>	63	590.3334	3
					(289)K.LNELLAK.F <sup>(286)</sup>	33	457.7708	2
					(301)K.KYASSANLHLPK.L <sup>(312)</sup>	60	443.5809	3
					(302)K.YASSANLHLPK.L <sup>(312)</sup>	45	600.8180	2
					(313)K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	52	584.8113	2
					(313)K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	75	584.8132	2
					(323)K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	57	536.2960	2
					(323)K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	35	536.3103	2
					(323)K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	57	536.8101	2
					(323)K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	35	536.8130	2
					(333)R.VFSNGADLSGITEEQPLMVSK.A <sup>(353)</sup>	48	1111.044	2
							6	
					(333)R.VFSNGADLSGITEEQPLMVSK.A <sup>(353)</sup>	34	1112.056	2
							8	
					(333)R.VFSNGADLSGITEEQPLMVSK.A + Oxidation(M) <sup>(353)</sup>	41	1120.053	2
							6	
Spot 9	56.18/5.21	57526646	630	31	(48)K.IAPNLANFAFSIYHK.L <sup>(62)</sup>	40	569.3076	3
					(148)K.LVDTFLEDVK.N <sup>(157)</sup>	51	589.7925	2

					(148) K.LVDTFLEDVK.N <sup>(170)</sup>	56	589.8215	2	
					(164) K.AFSINFR.D <sup>(152)</sup>	42	427.7303	2	
					(178) K.KINDYVEK.G <sup>(185)</sup>	28	504.7743	3	
					(179) K.INDYVEK.G <sup>(185)</sup>	24	440.7266	2	
					(214) K.GKWEKPFEVEHTTER.D <sup>(228)</sup>	44	468.9866	4	
					(216) K.WEKPFEVEHTTER.D <sup>(228)</sup>	52	563.2751	3	
					(229) R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	67	659.3196	2	
					(229) R.DFHVNEQTTVK.V <sup>(239)</sup>	31	439.8871	3	
					(246) R.LGMFDLHYCDK.L + Oxidation(M) <sup>(256)</sup>	35	472.2074	4	
					(246) R.LGMFDLHYCDK.L + Oxidation(M) <sup>(256)</sup>	78	707.8141	2	
					(302) K.YASSANLHLPK.L <sup>(312)</sup>	40	600.8239	2	
					(313) K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	49	584.7869	2	
					(313) K.LSISETYDLK.T <sup>(322)</sup>	53	584.8117	2	
					(323) K.TVLGELGINR.V <sup>(332)</sup>	55	536.3112	2	
					(333) R.VFSNGADLSGITEEQPLMVSK.A <sup>(353)</sup>	50	1112.055	2	
							3		
					(333) R.VFSNGADLSGITEEQPLMVSK.A + Oxidation (M) <sup>(353)</sup>	46	1119.564		
							3		
					(333) R.VFSNGADLSGITEEQPLMVSK.A + Oxidation (M) <sup>(353)</sup>	26	1120.054		
							2		
<hr/>									
<b>Vitamin D-binding protein</b>									
<b>Spot 7</b>	55.86/5.06	426231846	156	13	(219) R.ICSQYAAYGK.E <sup>(228)</sup>	35	580.7792	2	
					(277) K.ELPEYTVK.L <sup>(284)</sup>	22	489.7638	2	
					(323) K.LPDVQLPTNK.D <sup>(332)</sup>	25	562.8212	2	
					(371) K.SLDECCHSESSAACLNK.G <sup>(388)</sup>	45	699.6180	3	
					(428) R.GKFPDATETDLQELVAK.L <sup>(444)</sup>	31	621.3249	3	
<b>Spot 8</b>	54.21/5.13	426231846	378	21	(219) R.ICSQYAAYGK.E <sup>(228)</sup>	57	580.7764	2	
					(243) K.VPTAHLEDVPLAEDITTILSK.C <sup>(264)</sup>	66	792.4423	3	
					(323) K.LPDVQLPTNK.D <sup>(332)</sup>	37	562.8223	2	
					(338) K.GNTNVLDQYIFELSR.K <sup>(352)</sup>	72	884.9520	2	
					(353) R.KTQIPEVFLSK.I <sup>(363)</sup>	62	645.3807	2	

<b>Spot 9</b>	56.18/5.21	426231846	619	37	(354)K.TQIPEVFLSK.I <sup>(363)</sup>	29	581.3326	2
					(371)K.SLDECCHSESSAACLNEK.G <sup>(388)</sup>	30	699.6156	3
					(428)R.GKFPDATETDLQELVAK.L <sup>(444)</sup>	28	621.3241	3
					(38)K.EDFTSLSMVLYSR.K + Oxidation(M) <sup>(50)</sup>	53	782.3774	2
					(128)K.HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR.N <sup>(149)</sup>	43	903.0759	3
					(208)K.HLSLLTIMSNR.I <sup>(218)</sup>	44	642.8668	2
					(219)R.ICSQYAAYGK.E <sup>(228)</sup>	46	580.7781	2
					(243)K.VPTAHLEDVPLAEDITTILSK.C <sup>(264)</sup>	68	792.4415	3
					(304)K.TPMDIFVCAYFMPASPNPK.L +2	28	1109.514	2
					Oxidation(M) <sup>(322)</sup>		0	
					(323)K.LPDVQLPTNK.D <sup>(332)</sup>	54	562.8157	2
					(338)K.GNTNVLDQYIFELSR.K <sup>(352)</sup>	97	884.9536	2
					(353)R.KTQIPEVFLSK.I <sup>(363)</sup>	77	645.3803	2
					(354)K.TQIPEVFLSK.I <sup>(363)</sup>	20	581.3323	2
					(371)K.SLDECCHSESSAACLNEK.G <sup>(388)</sup>	30	699.6170	3
					(395)R.ELSSFIQK.G <sup>(402)</sup>	25	476.2627	2
(428)R.GKFPDATETDLQELVAK.L <sup>(444)</sup>	41	621.3235	3					
<b>Alpha-1B-glycoprotein</b>								
<b>Spot 10</b>	66.43/5.04	426244361	849	38	(63)K.DGVGQEPVHLESPAHEHR.F <sup>(80)</sup>	80	499.2413	4
					(81)R.FPLGPVTSTTR.G <sup>(91)</sup>	32	587.8189	2
					(81)R.FPLGPVTSTTR.G <sup>(91)</sup>	29	588.3232	2
					(81)R.FPLGPVTSTTR.G <sup>(91)</sup>	32	588.3278	2
					(81)R.FPLGPVTSTTR.G <sup>(91)</sup>	65	588.3284	2
					(98)R.YKGNDDWISPSK.L <sup>(109)</sup>	91	705.3432	2
					(155)R.QEGKDQFVEVAEAEPEATQASFPVHR.A <sup>(179)</sup>	70	693.3419	4
					(159)K.DQFVEVAEAEPEATQASFPVHR.A <sup>(179)</sup>	96	776.7166	3
					(220)R.ESAQVLRPGSPASLTCVAPLSDVDFQLR.R <sup>(247)</sup>	93	1005.187	3
							8	
					(249)R.GAEEQLVPR.A <sup>(257)</sup>	68	499.7683	2
					(317)R.ALWTGALTPGR.D <sup>(327)</sup>	77	571.8222	2

Spot 11	66.54/5.09	426244361	770	37	(333) R.CEAQVPDVSFLLLR.A <sup>(346)</sup>	30	823.4228	2
					(333) R.CEAQVPDVSFLLLR.A <sup>(346)</sup>	71	823.9376	2
					(347) R.AGEEEEPLAVAWSTNR.F <sup>(361)</sup>	72	815.4034	2
					(362) R.FADLVLTHVGR.Q <sup>(372)</sup>	46	409.8983	3
					(362) R.FADLVLTHVGR.Q <sup>(372)</sup>	65	614.349	2
					(63) K.DGVGQEPVHLESPAHEHR.F <sup>(80)</sup>	75	499.2420	4
					(81) R.FPLGPVTSTTR.G <sup>(91)</sup>	71	588.3283	2
					(81) R.FPLGPVTSTTR.G <sup>(91)</sup>	39	588.3287	2
					(98) R.YKGNDWISPSK.L <sup>(109)</sup>	96	705.3405	2
					(159) K.DQFVEVAEAEPEATQASFPVHR.A <sup>(179)</sup>	112	776.7165	3
					(220) R.ESAQVLRPGSPASLTCVAPLSDVDFQ LR.R <sup>(247)</sup>	64	1005.187	3
					(249) R.GAEEQLVPR.A <sup>(257)</sup>	68	499.7689	2
					(317) R.ALWTGALTPGR.D <sup>(327)</sup>	77	571.8209	2
					(333) R.CEAQVPDVSFLLLR.A <sup>(346)</sup>	60	823.4220	2
					(333) R.CEAQVPDVSFLLLR.A <sup>(346)</sup>	73	823.9371	2
(333) R.CEAQVPDVSFLLLR.A <sup>(346)</sup>	30	823.9377	2					
(347) R.AGEEEEPLAVAWSTNR.F <sup>(361)</sup>	75	815.4014	2					
(362) R.FADLVLTHVGR.Q <sup>(372)</sup>	45	409.8994	3					
(362) R.FADLVLTHVGR.Q <sup>(372)</sup>	60	614.3488	2					
Spot 12	66.30/5.18	426244361	834	38	(63) K.DGVGQEPVHLESPAHEHR.F <sup>(80)</sup>	98	499.2435	4
					(81) R.FPLGPVTSTTR.G <sup>(91)</sup>	70	588.3178	2
					(81) R.FPLGPVTSTTR.G <sup>(91)</sup>	27	588.3266	2
					(98) R.YKGNDWISPSK.L <sup>(109)</sup>	30	470.5625	3
					(98) R.YKGNDWISPSK.L <sup>(109)</sup>	93	705.3432	2
					(155) R.QEGKDQFVEVAEAEPEATQASFPVHR. A <sup>(179)</sup>	73	693.3401	4
					(155) R.QEGKDQFVEVAEAEPEATQASFPVHR. A <sup>(179)</sup>	96	924.1208	3
					(159) K.DQFVEVAEAEPEATQASFPVHR.A <sup>(179)</sup>	99	776.7169	3
					(159) K.DQFVEVAEAEPEATQASFPVHR.A <sup>(179)</sup>	99	776.7169	3



					(220)ESAQVLRPGSPASLTCVAPLSDVDFQLR	66	1005.188	3
					.R <sup>(247)</sup>		5	
					(249)R.GAEEQLVPR.A <sup>(257)</sup>	68	499.7690	2
					(317)R.ALWTGALTPGR.D <sup>(327)</sup>	73	571.8164	2
					(333)R.CEAQVPDVSFLLLR.A <sup>(346)</sup>	29	823.9365	2
					(333)R.CEAQVPDVSFLLLR.A <sup>(346)</sup>	45	823.9365	2
					(333)R.CEAQVPDVSFLLLR.A <sup>(346)</sup>	38	824.4307	2
					(347)R.AGEEEPLAVAWSTNR.F <sup>(361)</sup>	68	815.4048	2
					(362)R.FADLVLTHVGR.Q <sup>(372)</sup>	49	409.8970	3
					(362)R.FADLVLTHVGR.Q <sup>(372)</sup>	59	614.3486	2
<b>Endoplasmin</b>								
<b>Spot 13</b>	102.00/5.00	426225145	938	26	(76)K.FAFQAEVNR.M <sup>(84)</sup>	70	541.2773	2
					(88)K.LIINSLYK.N <sup>(952)</sup>	34	482.7911	2
					(103)R.ELISNASDALDK.I <sup>(114)</sup>	77	638.3273	2
					(117)R.LISLTDENALAGNEELTVK.I <sup>(135)</sup>	58	1015.546	2
							0	
					(143)K.NLLHVTDGTGVMTR.E + Oxidation(M) <sup>(156)</sup>	73	510.5959	3
					(143)K.NLLHVTDGTGVMTR.E + Oxidation(M) <sup>(156)</sup>	52	765.3937	2
					(253)K.EEASDYLELDTIK.N <sup>(265)</sup>	61	763.3717	2
					(271)K.YSQFINFPIYVWSSK.T <sup>(285)</sup>	20	939.9825	2
					(385)K.SILFVPTSAPR.G <sup>(395)</sup>	52	594.3406	2
					(396)R.GLFDEYGSK.K <sup>(404)</sup>	41	508.2542	2
					(435)K.GVVDSDDLPLNVS.R.E <sup>(448)</sup>	93	743.3879	2
					(512)R.FQSSHPSDMTSLDQYVER.M <sup>(530)</sup>	34	566.5061	4
					(512)R.FQSSHPSDMTSLDQYVER.M + Oxidation(M) <sup>(530)</sup>	39	570.7548	4
					(512)R.FQSSHPSDMTSLDQYVER.M + Oxidation(M) <sup>(530)</sup>	34	760.6727	3
					(538)K.IYFMAGASR.K + Oxidation (M) <sup>(546)</sup>	39	516.2563	2

					(548)K.EAESSPFVER.L <sup>(557)</sup>	78	575.7758	2
					(614)K.EFEPLLNWMK.D + Oxidation(M) <sup>(623)</sup>	30	661.8301	2
					(640)R.LTESPCALVASQYGWSGNMER.I + Oxidation (M) <sup>(660)</sup>	102	1186.545	2
					(672)K.DISTNYYASQK.K <sup>(682)</sup>	24	645.3068	2
					(672)K.DISTNYYASQK.K <sup>(682)</sup>	44	645.3076	2
					(672)K.DISTNYYASQK.K <sup>(682)</sup>	24	645.8006	2
					(725)R.SGYLLPDTK.A <sup>(733)</sup>	36	497.2680	2
<hr/>								
<b>Immunoglobulin mu chain, partial</b>								
<b>Spot 14</b>	77.91/5.13	165945	140	9	(173)R.IVSDISEGQVETVQSSPTTYR.A <sup>(193)</sup>	73	1148.580	2
						0		
					(194)R.AYSVLTITER.E <sup>(203)</sup>	39	576.8206	2
					(338)K.DVAMKPPSVYVLPTR.E + Oxidation(M) <sup>(353)</sup>	28	595.9927	3
<hr/>								
<b>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</b>								
<b>Spot 15</b>	92.60/5.40	426222300	468	12	(287)R.GILLYGPPGTGK.T <sup>(298)</sup>	28	586.8418	2
					(336)K.AFEEAEKNAPAIIFIDELDAIAPK.R <sup>(359)</sup>	24	872.4614	3
					(343)K.NAPAIIFIDELDAIAPK.R <sup>(359)</sup>	29	906.0093	2
					(343)K.NAPAIIFIDELDAIAPK.R.E <sup>(360)</sup>	35	656.3707	3
					(371)R.IVSQLLTLMDGLK.Q + Oxidation(M) <sup>(383)</sup>	66	723.9209	2
					(371)R.IVSQLLTLMDGLKQR.A + Oxidation(M) <sup>(385)</sup>	38	577.6671	2
					(560)K.GVLFYGPFGCGK.T <sup>(571)</sup>	39	626.3170	2
					(615)R.QAAPCVLFFDELDSIAK.A <sup>(631)</sup>	55	962.4866	2
					(686)R.LDQLIYIPLPDEK.S <sup>(698)</sup>	54	778.9368	2
					(725)K.MTNGFSGADLTEICQR.A + Oxidation(M) <sup>(740)</sup>	104	908.9013	2
<hr/>								
<b>Plastin-2</b>								
<b>Spot 16</b>	62.23/5.35	426236309	875	29	(4)R.GSVSDEEMMELR.E +2 Oxidation(M) <sup>(15)</sup>	23	707.7990	2
					(40)K.AACLPLPGYR.V <sup>(49)</sup>	37	559.2980	2

					(124)K.YAFVNWINK.A <sup>(132)</sup>	40	577.8062	2
					(166)K.MINLSVPDTIDER.T + Oxidation(M) <sup>(178)</sup>	72	759.8821	2
					(166)K.MINLSVPDTIDER.T + Oxidation(M) <sup>(178)</sup>	52	759.8826	2
					(254)R.EGESLEDLMK.L + Oxidation(M) <sup>(263)</sup>	46	583.7705	2
					(254)R.EGESLEDLMKLSPEELLR.W + Oxidation(M) <sup>(272)</sup>	45	739.7164	3
					(264)K.LSPEELLR.W <sup>(272)</sup>	55	535.3195	2
					(286)K.INNFSSDIKDSK.A <sup>(297)</sup>	64	684.8398	2
					(298)K.AYYHLLEQVAPK.G <sup>(309)</sup>	35	477.9266	3
					(298)K.AYYHLLEQVAPK.G <sup>(309)</sup>	50	716.3906	
					(298)K.AYYHLLEQVAPKGDEEGIPAVVIDMS GLR.E + Oxidation(M) <sup>(309)</sup>	61	797.4122	4
					(348)R.QFVTATDVVR.G <sup>(357)</sup>	51	568.3128	2
					(402)R.NWMNSLGVNPR.V <sup>(412)</sup>	28	644.3216	2
					(402)R.NWMNSLGVNPR.V + Oxidation(M) <sup>(412)</sup>	64	652.3178	2
					(456)K.KLENCNYAVELGK.N <sup>(468)</sup>	32	513.2623	3
					(457)K.KLENCNYAVELGKNQAK.F <sup>(472)</sup>	39	617.6582	3
					(473)K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T <sup>(488)</sup>	88	838.4293	2
					(597)R.VYALPEDLVEVNPK.M <sup>(610)</sup>	67	793.4340	2
					(611)K.MVMTVFACLMGK.G + 3 Oxidation (M) <sup>(622)</sup>	47	718.3296	2
<hr/>								
<b>Heat shock-related 70 kDa protein 2</b>								
<b>Spot 17</b>	65.00/5.57	426233526	885	21	(27)K.VEIIANDQG NR.T <sup>(37)</sup>	76	614.8186	2
					(38)R.TTPSYVAFTDTER.L <sup>(50)</sup>	66	744.3308	2
					(114)K.TFFPEEISSMVLTK.M + Oxidation(M) <sup>(127)</sup>	56	822.9187	2
					(128)K.MKEIAEAYLG GK.V + Oxidation(M) <sup>(139)</sup>	76	663.3464	2
					(130)K.EIAEAYLG GK.V <sup>(139)</sup>	51	525.7799	2
					(140)K.VQSAVITVPAYFNDSQR.Q <sup>(156)</sup>	62	947.9934	2
					(173)R.IINEPTAAAIA YGLDK.K <sup>(188)</sup>	55	830.4558	2

					(173) R.IINEPTAAAIA YGLDK.K <sup>(188)</sup>	57	830.9171	2
					(173) R.IINEPTAAAIA YGLDKK.G <sup>(189)</sup>	41	596.6695	3
					(173) R.IINEPTAAAIA YGLDKK.G <sup>(189)</sup>	88	894.5048	2
					(224) K.STAGDTHLGGEDFDNR.M <sup>(239)</sup>	60	564.5791	2
					(224) K.STAGDTHLGGEDFDNR.M <sup>(239)</sup>	61	846.3717	2
					(303) R.ARFEELNADLFR.G <sup>(314)</sup>	108	740.8829	2
					(305) R.FEELNADLFR.G <sup>(314)</sup>	66	627.3037	2
					(332) K.GQIQEIVLVGGSTR.I <sup>(345)</sup>	79	728.9139	2
					(462) K.FDLTGIPPAPR.G <sup>(472)</sup>	44	592.3300	2
<b>Heat shock cognate 71 kDa protein</b>								
<b>Spot 17</b>	65.00/5.57	426244714	1389	36	(26) K.VEIIANDQGNR.T <sup>(36)</sup>	76	614.8186	2
					(37) R.TTPSYVAFTDTER.L <sup>(49)</sup>	66	744.3308	2
					(57) K.NQVAMNPTNTVFDK.R <sup>(71)</sup>	73	825.4018	2
					(57) K.NQVAMNPTNTVFDK.R <sup>(71)</sup>	21	825.8978	2
					(57) K.NQVAMNPTNTVFDK.R + Oxidation(M) <sup>(71)</sup>	86	833.3840	2
					(57) K.NQVAMNPTNTVFDK.R + Oxidation(M) <sup>(71)</sup>	70	833.8962	2
					(77) R.RFDDAVVQSDMK.H + Oxidation(M) <sup>(88)</sup>	70	713.8416	2
					(78) R.FDDAVVQSDMK.H + Oxidation(M) <sup>(88)</sup>	71	635.7895	2
					(89) K.HWPFMVVNDAGRPK.V <sup>(102)</sup>	38	551.9558	3
					(89) K.HWPFMVVNDAGRPK.V + Oxidation(M) <sup>(102)</sup>	48	557.2813	3
					(113) K.SFYPEEVSSMVLTK.M <sup>(126)</sup>	34	808.9034	2
					(113) K.SFYPEEVSSMVLTK.M <sup>(126)</sup>	16	808.9034	2
					(113) K.SFYPEEVSSMVLTK.M + Oxidation(M) <sup>(126)</sup>	61	816.8848	2
					(127) K.MKEIAEAYLGK.T <sup>(137)</sup>	70	626.8378	2
					(127) K.MKEIAEAYLGK.T + Oxidation(M) <sup>(137)</sup>	84	634.8169	2
					(127) K.MKEIAEAYLGK.T + Oxidation(M) <sup>(137)</sup>	37	423.5562	3
					(138) K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q <sup>(155)</sup>	24	991.5079	2

(138)	K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q <sup>(155)</sup>	33	661.3514	2
(138)	K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q <sup>(155)</sup>	24	991.9975	2
(138)	K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q <sup>(155)</sup>	33	661.6719	2
(160)	K.DAGTIAGLNVLRI <sup>(171)</sup>	70	600.3096	2
(160)	K.DAGTIAGLNVLRI <sup>(171)</sup>	46	600.3448	2
(160)	K.DAGTIAGLNVLRI <sup>(171)</sup>	70	600.7316	2
(172)	R.IINEPTAAAIA YGLDK.K <sup>(187)</sup>	55	830.4558	2
(172)	R.IINEPTAAAIA YGLDK.K <sup>(187)</sup>	57	830.9171	2
(172)	R.IINEPTAAAIA YGLDKK.V <sup>(188)</sup>	41	596.6695	3
(172)	R.IINEPTAAAIA YGLDKK.V <sup>(188)</sup>	88	894.5048	2
(221)	K.STAGDTHLGGEDFDNR.M <sup>(236)</sup>	60	564.5791	3
(221)	K.STAGDTHLGGEDFDNR.M <sup>(236)</sup>	61	846.3717	2
(237)	R.MVNHFIAEFK.R <sup>(246)</sup>	52	618.3118	2
(237)	R.MVNHFIAEFK.R <sup>(246)</sup>	24	412.5442	3
(237)	R.MVNHFIAEFK.R + Oxidation(M) <sup>(246)</sup>	25	417.8766	3
(237)	R.MVNHFIAEFK.R + Oxidation(M) <sup>(246)</sup>	38	626.3129	2
(300)	R.ARFEELNADLFR.G <sup>(311)</sup>	108	740.8829	2
(302)	R.FEELNADLFR.G <sup>(311)</sup>	66	627.3037	2
(326)	K.LDKSQIHDI VLVGGSTR.I <sup>(342)</sup>	34	613.6708	3
(329)	K.SQIHDI VLVGGSTR.I <sup>(342)</sup>	70	741.3989	2
(329)	K.SQIHDI VLVGGSTR.I <sup>(342)</sup>	52	494.6087	3
(362)	K.SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK.S <sup>(384)</sup>	69	754.0562	3
(362)	K.SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK.S <sup>(384)</sup>	82	1130.585	2
	)		6	
(540)	K.NSLESYAFNMK.A <sup>(550)</sup>	31	652.3077	2
(540)	K.NSLESYAFNMK.A + Oxidation(M) <sup>(550)</sup>	62	660.3029	2
(540)	K.NSLESYAFNMK.A + Oxidation(M) <sup>(550)</sup>	38	660.7957	2
(574)	K.CNEIINWLDK.N <sup>(583)</sup>	53	652.8215	2
<b>Alpha-enolase</b>				
<b>Spot 22</b>	67.40/6.16	87196501	276	17
				(16)
				R.GNPTVEVDLFTAK.G <sup>(28)</sup>
				73
				695.8688
				2



					(344)K.VNQIGSVTESLQACK.L <sup>(358)</sup>	53	817.4044	2
					(344)K.VNQIGSVTESLQACK.L <sup>(358)</sup>	102	817.4044	2
					(344)K.VNQIGSVTESLQACK.L <sup>(358)</sup>	90	817.9114	2
					(359)K.LAQSNWGWVMVSHR.S <sup>(372)</sup>	45	514.5942	2
					(359)K.LAQSNWGWVMVSHR.S <sup>(372)</sup>	41	771.9062	2
					(359)K.LAQSNWGWVMVSHR.S + Oxidation(M) <sup>(372)</sup>	72	519.9248	3
					(359)K.LAQSNWGWVMVSHR.S + Oxidation(M) <sup>(372)</sup>	37	779.3887	2
					(359)K.LAQSNWGWVMVSHR.S + Oxidation(M) <sup>(372)</sup>	57	520.2523	3
					(413)R.IEEELGSK.A <sup>(420)</sup>	43	452.7372	2
<b>Serotransferrin</b>								
<b>Spot 24</b>	82.82/6.53	426218284	1564	53	(27)R.WCTISTHEANK.C <sup>(37)</sup>	25	449.5438	3
					(48)R.IFENGPVFCVK.K <sup>(59)</sup>	82	698.8527	2
					(69)K.AISNNEADAVTLDGGLVYEAGLKPNN LKPVVAEFHGTK.D <sup>(106)</sup>	49	791.2152	5
					(69)K.AISNNEADAVTLDGGLVYEAGLKPNN LKPVVAEFHGTK.D <sup>(106)</sup>	21	988.7681	4
					(107)K.DNPQTHYYAVAVVK.K <sup>(120)</sup>	82	802.9140	2
					(121)K.KGTDFNLNELK.G <sup>(131)</sup>	77	639.8411	2
					(122)K.GTDFNLNELK.G <sup>(131)</sup>	45	575.7911	2
					(143)R.SAGWNIPMGR.L <sup>(152)</sup>	38	544.7706	2
					(156)K.ELPDPQESIQR.A <sup>(166)</sup>	62	656.3328	2
					(167)R.AAASFFSASCVPACDQSSFPK.L <sup>(187)</sup>	28	1118.006	2
							8	
					(200)K.CACSNHEPYFGYAGAFK.C <sup>(216)</sup>	44	660.2785	3
					(217)K.CLAEGSGDVAFVK.H <sup>(229)</sup>	70	676.8223	2
					(230)K.HSTVFDNLPNPDDRK.D <sup>(244)</sup>	50	585.6206	3
					(244)R.KDYELLCGDNTR.K <sup>(255)</sup>	72	742.3513	2
					(245)K.DYELLCGDNTR.K <sup>(255)</sup>	26	678.3028	2

					(300)K.DKPDNFQLFQSPHGK.D <sup>(314)</sup>	28	586.6268	3
					(351)R.ESKPPDTSTDECK.V <sup>(363)</sup>	34	747.3289	2
					(366)K.WCAIGHQER.T <sup>(374)</sup>	64	578.7732	2
					(406)K.GEADAMSLDGGYLYIAGK.C <sup>(423)</sup>	37	915.9402	2
					(406)K.GEADAMSLDGGYLYIAGK.C + Oxidation (M) <sup>(423)</sup>	40	923.9360	2
					(457)K.ASDADLNWNNLK.G <sup>(468)</sup>	61	680.8325	2
					(480)R.TAGWNIPMGLLYSK.I <sup>(493)</sup>	60	775.9106	2
					(480)R.TAGWNIPMGLLYSK.I + Oxidation(M) <sup>(493)</sup>	54	783.9083	2
					(480)R.TAGWNIPMGLLYSK.I + Oxidation(M) <sup>(493)</sup>	29	783.9097	2
					(499)K.FDEYFSAGCAPGSQR.N <sup>(513)</sup>	69	846.3550	2
					(531)K.ECVPNSNER.Y <sup>(539)</sup>	47	552.7441	2
					(540)R.YYGYTGAFR.C <sup>(548)</sup>	35	549.2512	2
					(540)R.YYGYTGAFR.C <sup>(548)</sup>	35	549.7571	2
					(549)R.CLVEKGDVAFVK.D <sup>(560)</sup>	38	682.3381	2
					(554)K.GDVAFVKDQTVK.Q <sup>(565)</sup>	40	653.8589	2
					(566)K.QNTDGNNGEEWAK.D <sup>(578)</sup>	43	731.8167	2
					(582)K.KGDFELLCK.D <sup>(590)</sup>	42	555.2891	2
					(583)K.KGDFELLCK.D <sup>(590)</sup>	38	491.2410	2
					(637)K.AVTDCTSNFCLFQSTSK.D <sup>(653)</sup>	90	983.4451	2
					(671)K.TYDSYLGDDYVR.A <sup>(682)</sup>	72	733.8284	2
					(695)K.LLEACTFHKP.- <sup>(704)</sup>	28	608.3152	2
Spot 25	79.57/6.63	426218284	1483	43	(27)R.WCTISTHEANK.C <sup>(37)</sup>	26	449.5441	3
					(48)R.IFENGPVSCVK.K <sup>(59)</sup>	82	698.8522	2
					(48)R.IFENGPVSCVK.K <sup>(59)</sup>	27	699.3460	2
					(107)K.DNPQTHYYAVAVVK.K <sup>(120)</sup>	84	802.9078	2
					(107)K.DNPQTHYYAVAVVK.K <sup>(120)</sup>	36	535.6079	3
					(107)K.DNPQTHYYAVAVVK.K <sup>(120)</sup>	21	803.4045	2
					(121)K.KGTDFNLNELK.G <sup>(131)</sup>	91	639.8414	2



(122) K.GTDFNLNELK.G <sup>(131)</sup>	45	575.7914	2
(143) R.SAGWNIPMGR.L + Oxidation(M) <sup>(152)</sup>	22	552.7687	2
(156) K.ELPDPQESIQR.A <sup>(166)</sup>	64	656.3325	2
(167) R.AAASFFSASCVPCADQSSFPK.L <sup>(187)</sup>	48	1118.005	2
		7	
(200) K.CACSNHEPYFGYAGAFK.C <sup>(216)</sup>	43	660.2787	3
(217) K.CLAEGSGDVAFVK.H <sup>(229)</sup>	93	676.8120	2
(217) K.CLAEGSGDVAFVK.H <sup>(229)</sup>	42	676.8339	2
(217) K.CLAEGSGDVAFVK.H <sup>(229)</sup>	42	677.3227	2
(230) K.HSTVFDNLNPDDR.K.D <sup>(244)</sup>	56	585.6207	3
(244) R.KDYELLCGDNTR.K <sup>(255)</sup>	74	742.3494	2
(300) K.DKPDNFQLFQSPHGK.D <sup>(314)</sup>	29	586.6272	3
(320) K.DSADGFLK.I <sup>(327)</sup>	33	426.7081	2
(366) K.WCAIGHQER.T <sup>(374)</sup>	37	386.1818	2
(406) K.GEADAMSLDGGYLYIAGK.C + Oxidation(M) <sup>(423)</sup>	47	923.9367	2
(406) K.GEADAMSLDGGYLYIAGK.C + Oxidation(M) <sup>(423)</sup>	46	923.9378	2
(457) K.ASDADLNWNNLK.G <sup>(468)</sup>	78	680.8223	2
(480) R.TAGWNIPMGLLYSK.I <sup>(493)</sup>	67	775.9105	2
(480) R.TAGWNIPMGLLYSK.I + Oxidation(M) <sup>(493)</sup>	28	783.9077	2
(480) R.TAGWNIPMGLLYSK.I + Oxidation(M) <sup>(493)</sup>	56	783.9077	2
(499) K.FDEYFSAGCAPGSQR.N <sup>(513)</sup>	69	846.3618	2
(499) K.FDEYFSAGCAPGSQR.N <sup>(513)</sup>	19	846.3630	2
(499) K.FDEYFSAGCAPGSQR.N <sup>(513)</sup>	19	846.8532	2
(540) R.YYGYTGAFR.C <sup>(548)</sup>	35	549.2418	2
(549) R.CLVEKGDVAFVK.D <sup>(560)</sup>	28	682.3361	2
(582) K.KGDFELLCK.D <sup>(590)</sup>	38	555.2889	2
(583) K.GDFELLCK.D <sup>(590)</sup>	39	491.2392	2

Spot 26	78.80/6.72	426218284	1352	37	(637) K.AVTDCTSNFCLFQSTSK.D <sup>(653)</sup>	85	983.4461	2
					(670) K.KTYDSYLGDDYVR.A <sup>(682)</sup>	89	797.8761	2
					(671) K.TYDSYLGDDYVR.A <sup>(682)</sup>	60	733.8299	2
					(695) K.LLEACTFHKP.- <sup>(704)</sup>	32	608.3175	2
					(48) R.IFENGPVSCVK.K <sup>(59)</sup>	82	698.8469	2
					(48) R.IFENGPVSCVK.K <sup>(59)</sup>	20	699.3480	2
					(107) K.DNPQTHYYAVAVVK.K <sup>(120)</sup>	72	802.9124	2
					(121) K.KGTDFNLNELK.G <sup>(131)</sup>	86	639.8306	2
					(122) K.GTDFNLNELK.G <sup>(131)</sup>	45	575.7887	2
					(143) R.SAGWNIPMGR.L + Oxidation(M) <sup>(152)</sup>	43	552.7702	2
					(156) K.ELPDPQESIQR.A <sup>(166)</sup>	52	656.3214	2
					(188) K.LCQLCAGK.G <sup>(195)</sup>	25	475.2362	2
					(200) K.CACSNHEPYFGYAGAFK.C <sup>(216)</sup>	33	660.2813	3
					(230) K.HSTVFDNLPNPDDR.K <sup>(243)</sup>	107	813.8871	2
					(230) K.HSTVFDNLPNPDDR.K.D <sup>(244)</sup>	49	585.6209	3
					(244) R.KDYELLCGDNTR.K <sup>(255)</sup>	52	742.3521	2
					(245) K.DYELLCGDNTR.K <sup>(255)</sup>	35	678.3038	2
					(269) K.VPSHAVVAR.T <sup>(277)</sup>	53	468.2778	2
					(300) K.DKPDNFQLFQSPHGK.D <sup>(314)</sup>	27	586.6036	3
					(300) K.DKPDNFQLFQSPHGK.D <sup>(314)</sup>	60	879.4404	2
					(406) K.GEADAMSLDGGYLYIAGK.C + Oxidation(M) <sup>(423)</sup>	74	923.9368	2
					(457) K.ASDADLNWNNLK.G <sup>(468)</sup>	48	680.8339	2
					(480) R.TAGWNIPMGLLYSK.I <sup>(493)</sup>	46	775.9110	2
					(480) R.TAGWNIPMGLLYSK.I + Oxidation(M) <sup>(493)</sup>	32	783.9096	2
					(480) R.TAGWNIPMGLLYSK.I + Oxidation(M) <sup>(493)</sup>	62	783.9110	2
					(499) K.FDEYFSAGCAPGSQR.N <sup>(513)</sup>	53	846.3590	2
(540) R.YYGYTGAFR.C <sup>(548)</sup>	35	549.2335	2					
(540) R.YYGYTGAFR.C <sup>(548)</sup>	35	549.7488	2					

					(554)K.GDVAFVKDQTVK.Q <sup>(565)</sup>	45	653.8579	2
					(582)K.KGDFELLCK.D <sup>(590)</sup>	45	555.2703	2
					(582)K.KGDFELLCK.D <sup>(590)</sup>	45	555.7859	2
					(583)K.KGDFELLCK.D <sup>(590)</sup>	26	491.2406	2
					(637)K.AVTDCTSNFCLFQSTSK.D <sup>(653)</sup>	84	983.4484	2
					(671)K.TYDSYLGDDYVR.A <sup>(682)</sup>	70	733.8155	2
					(695)K.LLEACTFHKP.- <sup>(704)</sup>	28	608.3070	2
<b>Immunoglobulin gamma-1 chain</b>								
<b>Spot 27</b>	46.63/5.80	388235	270	17	(240)R.VEPGCPDCK.H <sup>(249)</sup>	27	579.7531	2
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	19	1080.571	2
						8		
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	20	721.0568	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	26	721.0573	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	42	721.0574	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	26	721.3856	3
					(326)R.VVSALPIQHQDWTGGK.E <sup>(341)</sup>	62	579.3085	3
					(326)R.VVSALPIQHQDWTGGK.E <sup>(341)</sup>	41	868.4671	2
					(369)R.EPQVYVLAPPQEELSK.S <sup>(384)</sup>	41	913.9873	2
					(417)K.YGTTTSQLDADGSYFLYSR.L <sup>(435)</sup>	100	1073.000	2
						0		
<b>Spot 28</b>	46.59/5.97	388235	346	24	(240)R.VEPGCPDCK.H <sup>(249)</sup>	48	579.7533	2
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	20	720.7154	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	20	721.0456	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	35	721.0561	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	49	721.0571	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	35	721.3866	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	20	721.3870	3
					(326)R.VVSALPIQHQDWTGGK.E <sup>(341)</sup>	29	868.4674	2
					(326)R.VVSALPIQHQDWTGGK.E <sup>(341)</sup>	15	579.6378	3
					(369)R.EPQVYVLAPPQEELSK.S <sup>(384)</sup>	39	913.9882	2
					(369)R.EPQVYVLAPPQEELSK.S <sup>(384)</sup>	24	913.9905	2

<b>Spot 29</b>	46.88/6.14	388235	262	17	(408)K.NGQPESEDKYGTTSQLDADGSYFLY	63	1044.132	3
					SR.L <sup>(435)</sup>		3	
					(417)K.YGTTTSQLDADGSYFLYSR.L <sup>(435)</sup>	91	1073.000	2
							5	
					(441)K.NSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQ	25	755.3368	4
					K.S <sup>(465)</sup>			
					(441)K.NSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQ	25	755.5776	4
					K.S <sup>(465)</sup>			
					(441)K.NSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQ	31	759.5833	4
					K.S + Oxidation(M) <sup>(465)</sup>			
					(240)R.VEPGCPDCK.H <sup>(249)</sup>	35	579.7542	2
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	19	1080.573	2
							2	
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	26	721.0575	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	39	721.0582	3
					(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	26	721.3857	3
					(326)R.VVSALPIQHQDWTGGK.E <sup>(341)</sup>	73	579.2996	3
(326)R.VVSALPIQHQDWTGGK.E <sup>(341)</sup>	56	868.4658	2					
(369)R.EPQVYVLAPPQEELSK.S <sup>(384)</sup>	37	913.9876	2					
(369)R.EPQVYVLAPPQEELSK.S <sup>(384)</sup>	28	913.9890	2					
(417)K.YGTTTSQLDADGSYFLYSR. <sup>(435)</sup>	29	1073.001	2					
		5						
(417)K.YGTTTSQLDADGSYFLYSR. <sup>(435)</sup>	79	1073.002	2					
		1						
(240)R.VEPGCPDCK.H <sup>(249)</sup>	25	579.7512	2					
(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	20	1080.572	2					
		6						
(253)R.CPPPELPGGPSVFIFPPKPK.D <sup>(272)</sup>	40	721.0566	2					
(326)R.VVSALPIQHQDWTGGK.E <sup>(341)</sup>	47	579.3114	3					
(326)R.VVSALPIQHQDWTGGK.E <sup>(341)</sup>	26	868.9586	3					
(369)R.EPQVYVLAPPQEELSK.S <sup>(384)</sup>	38	913.9878	2					
<b>Spot 30</b>	47.77/6.27	388235	239	17				

					(369)R.EPQVYVLAPPQEELSK.S <sup>(384)</sup>	17	913.9896	2
					(417)K.YGTTTSQLDADGSYFLYSR.L <sup>(435)</sup>	91	1073.001	2
							0	
<hr/>								
<b>Retinal dehydrogenase 1</b>								
<b>Spot 31</b>	51.45/6.78	57526379	804	34	(37)K.KFPVFNPAATEEK.L <sup>(48)</sup>	74	703.8715	2
					(92)K.LADLIER.D <sup>(98)</sup>	60	415.2461	2
					(101)R.LLLATMEAMNGGK.L <sup>(113)</sup>	50	675.3491	2
					(114)K.LFSNAYLMDLGGCIK.T <sup>(128)</sup>	64	851.4262	2
					(114)K.LFSNAYLMDLGGCIK.T + Oxidation(M) <sup>(128)</sup>	53	859.4237	3
					(132)R.YCAGWADK.I <sup>(139)</sup>	43	485.7110	2
					(144)R.TIPMDGNFFTYTR.S + Oxidation(M) <sup>(156)</sup>	37	789.8719	2
					(144)R.TIPMDGNFFTYTR.S + Oxidation(M) <sup>(156)</sup>	87	789.8725	2
					(180)K.IGPALSCGNTVVVKPAEQTPLTALHM GSLIK.E + Oxidation(M) <sup>(210)</sup>	32	805.4406	4
					(242)K.VAFTGSTEVGK.L <sup>(252)</sup>	59	548.2909	2
					(330)K.YVLGNPLTPGVSQGPQIDKEQYEK.I <sup>(353)</sup>	36	887.4630	3
					(354)K.ILDLIESGK.K <sup>(362)</sup>	54	494.2909	2
					(354)K.ILDLIESGKK.E <sup>(363)</sup>	60	558.3384	2
					(368)K.LECGGPPWGNK.G <sup>(378)</sup>	58	587.7725	2
					(399)K.EEIFGPVQQIMK.F + Oxidation(M) <sup>(410)</sup>	71	717.8725	2
					(413)K.SLDDVIKR.A <sup>(420)</sup>	60	473.2749	2
<b>Spot 32</b>	53.03/7.00	57526379	1170	62	(2)M.SSSAMPDVPAPLTNLQFK.Y + Oxidation(M) <sup>(19)</sup>	26	959.9895	2
					(23)K.IFINNEWHSSVSGK.K <sup>(36)</sup>	47	539.9395	3
					(37)K.KFPVFNPAATEEK.L <sup>(48)</sup>	59	703.8665	2
					(38)K.FPVFNPAATEEK.L <sup>(48)</sup>	65	639.8264	2
					(49)K.LCEVEEGDKEDVDK.A <sup>(62)</sup>	25	555.5836	3
					(69)R.QAFQIGSPWR.T <sup>(78)</sup>	56	595.3089	2
					(92)K.LADLIER.D <sup>(98)</sup>	44	415.2380	2

					(101)R.LLLATMEAMNGGK.L <sup>(113)</sup>	60	675.3479	2
					(114)K.LFSNAYLMDLGGCIK.T <sup>(128)</sup>	53	851.4271	2
					(114)114K.LFSNAYLMDLGGCIK.T + Oxidation(M) <sup>(128)</sup>	61	859.4244	2
					(132)R.YCAGWADK.I <sup>(139)</sup>	35	485.7110	2
					(144)R.TIPMDGNFFTYTR.S <sup>(156)</sup>	46	781.8743	2
					(144)R.TIPMDGNFFTYTR.S + Oxidation(M) <sup>(156)</sup>	70	789.8702	2
					(144)R.TIPMDGNFFTYTR.S + Oxidation(M) <sup>(156)</sup>	28	789.8717	2
					(144)R.TIPMDGNFFTYTR.S + Oxidation(M) <sup>(156)</sup>	28	790.3622	2
					(180)K.IGPALSCGNTVVVKPAEQTPLTALHM GSLIK.E + Oxidation (M) <sup>(210)</sup>	27	805.4394	2
					(211)K.EAGFPPGVVNI VPGYGP TAGAAISSH MDVDK.V + Oxidation (M) <sup>(241)</sup>	38	1023.841	3
					(211)K.EAGFPPGVVNI VPGYGP TAGAAISSH MDVDK.V + Oxidation (M) <sup>(241)</sup>	57	1023.842	3
					(242)K.VAFTGSTEVGK.L <sup>(252)</sup>	57	548.2807	2
					(266)R.VSLELGGK.S <sup>(273)</sup>	43	401.7329	2
					(309)R.LFVEESYDEFVR.R <sup>(321)</sup>	72	823.4158	2
					(330)K.YVLGNPLTPGVSQGPQIDKEQYEK.I <sup>(353)</sup>	39	887.4615	3
					(354)K.ILDLIESGK.K <sup>(362)</sup>	69	494.2922	2
					(368)K.LECGGPWGNK.G <sup>(378)</sup>	54	587.7722	2
					(399)K.EEIFGPVQQIMK.F <sup>(410)</sup>	61	709.8761	2
					(399)K.EEIFGPVQQIMK.F + Oxidation (M) <sup>(410)</sup>	41	717.8797	2
					(413)K.SLDDVIKR.A <sup>(420)</sup>	50	473.2737	2
					(421)R.ANNTFYGLSAGIFTNDIDK.A <sup>(439)</sup>	74	1031.009	2
					(477)R.ELGEYGFHEYTEVK.T <sup>(490)</sup>	23	850.8992	2
<b>Aldose reductase</b>								
<b>Spot 34</b>	34.13/6.60	426228047	602	37	(13)K.MPILGLGTWK.S <sup>(22)</sup>	59	558.3200	2
					(13)K.MPILGLGTWK.S + Oxidation (M) <sup>(22)</sup>	35	566.3069	2

					(13) K.MPILGLGTWK.S + Oxidation (M) <sup>(22)</sup>	73	566.3069	2
					(34) K.VAIDLGYR.H <sup>(41)</sup>	59	453.7526	2
					(42) R.HIDCAHVYQNESEVGLALQAK.L <sup>(62)</sup>	60	596.2933	4
					(42) R.HIDCAHVYQNESEVGLALQAK.L <sup>(62)</sup>	53	794.7268	3
					(159) K.AIGVSNFNHLQVEK.I <sup>(169)</sup>	59	519.2765	3
					(170) K.ILNKPGLK.Y <sup>(177)</sup>	39	441.7946	2
					(178) K.YKPAVNQIECHPYLTQEK.L <sup>(195)</sup>	79	740.0208	3
					(178) K.YKPAVNQIECHPYLTQEK.L <sup>(195)</sup>	28	740.0231	3
					(178) K.YKPAVNQIECHPYLTQEK.L <sup>(195)</sup>	23	740.3678	3
					(196) K.LIQYCNSK.G <sup>(203)</sup>	23	513.2606	2
					(244) K.TTAQVLIR.F <sup>(251)</sup>	60	451.2747	2
					(284) K.EDMNTLLSYNR.N + Oxidation(M) <sup>(294)</sup>	83	686.3176	2
					(298) R.ACALVSCASHR.D <sup>(308)</sup>	41	411.1932	3
					(298) R.ACALVSCASHR.D <sup>(308)</sup>	68	616.2899	2
<b>F-actin-capping protein subunit alpha-2</b>								
<b>Spot 35</b>	33.65/5.95	426227627	132	16	(134) K.EHYPNGVCTVYGK.K <sup>(146)</sup>	30	508.8979	3
					(134) K.EHYPNGVCTVYGK.K <sup>(146)</sup>	20	762.8479	2
					(147) K.KIDGQQTIIACIESHQFQAK.N <sup>(166)</sup>	32	772.4015	3
					(179) K.FTITPSTTQVVGILK.I <sup>(193)</sup>	70	802.9684	2
<b>Complement C3-like</b>								
<b>Spot 36</b>	38.17/5.51	426230658	222	6	(493) K.GQGTLVSVTVYHAK.L <sup>(506)</sup>	80	730.3962	2
					(493) K.GQGTLVSVTVYHAK.L <sup>(506)</sup>	46	487.2681	3
					(520) R.VSIRPALEPVK.K <sup>(530)</sup>	37	604.8671	2
					(605) K.ISHTQEDCLSFK.V <sup>(616)</sup>	30	488.8978	3
					(605) K.ISHTQEDCLSFK.V <sup>(616)</sup>	83	732.8469	2
					(617) K.VHQYFNVGLIQPGAVK.V <sup>(632)</sup>	22	590.6626	3
<b>Beta-actin</b>								
<b>Spot 37</b>	38.99/5.45	8809716	693	67	(1) -.TFYNELR.V <sup>(7)</sup>	43	471.7383	2
					(8) R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A <sup>(25)</sup>	21	652.0274	3
					(8) R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A <sup>(25)</sup>	57	977.5395	2
					(8) R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A <sup>(25)</sup>	21	652.3526	3

<sup>(60)</sup> R.TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPH AILR.L <sup>(89)</sup>	90	796.6536	4
<sup>(60)</sup> R.TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPH AILR.L + Oxidation(M) <sup>(89)</sup>	101	1067.214 8	3
<sup>(96)</sup> R.DLTDYLMK.I + Oxidation(M) <sup>(103)</sup>	30	507.7371	2
<sup>(96)</sup> R.DLTDYLMK.I + Oxidation(M) <sup>(103)</sup>	30	508.2433	2
<sup>(128)</sup> K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S <sup>(150)</sup> )	80	850.7344	3
<sup>(128)</sup> K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S <sup>(150)</sup> )	51	1275.602 8	2
<sup>(128)</sup> K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S + Oxidation(M) <sup>(150)</sup>	36	1283.595 5	2
<sup>(128)</sup> K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S + Oxidation(M) <sup>(150)</sup>	59	1283.596 9	2
<sup>(151)</sup> K.SYELPDGQVITIGNER.F <sup>(166)</sup>	101	895.8677	2
<sup>(151)</sup> K.SYELPDGQVITIGNER.F <sup>(166)</sup>	70	895.9453	2
<sup>(151)</sup> K.SYELPDGQVITIGNER.F <sup>(166)</sup>	74	895.9570	2
<sup>(151)</sup> K.SYELPDGQVITIGNER.F <sup>(166)</sup>	74	896.4451	2
<sup>(169)</sup> R.CPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIM K.C + Oxidation(M) <sup>(196)</sup>	24	1083.164 2	3
<sup>(169)</sup> R.CPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIM K.C + Oxidation(M) <sup>(196)</sup>	24	1083.495 7	3
<sup>(169)</sup> R.CPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIM K.C + 2 Oxidation (M) <sup>(196)</sup>	22	1088.150 8	3
<sup>(169)</sup> R.CPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIM K.C + 2 Oxidation (M) <sup>(196)</sup>	42	1088.497 2	3
<sup>(203)</sup> R.KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M + Oxidation (M) <sup>(224)</sup>	111	787.0515	3
<sup>(203)</sup> R.KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M + Oxidation (M) <sup>(224)</sup>	115	1180.093 5	2
<sup>(203)</sup> R.KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M +	111	787.3702	3



Spot 39	37.17/5.32	148744172	671	42	Oxidation (M) <sup>(224)</sup>				
					<sup>(203)</sup> R.KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M +	67	787.3892	3	
					Oxidation (M) <sup>(224)</sup>				
					<sup>(204)</sup> K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M <sup>(224)</sup>	119	1108.037	2	
							7		
					<sup>(204)</sup> K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M <sup>(224)</sup>	77	1108.048	2	
							8		
					<sup>(204)</sup> K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M +	125	1116.030	2	
					Oxidation (M) <sup>(224)</sup>		9		
					<sup>(19)</sup> K.AGFAGDDAPR.A <sup>(28)</sup>	93	488.7305	2	
					<sup>(19)</sup> K.AGFAGDDAPR.A <sup>(28)</sup>	32	488.7306	2	
					<sup>(29)</sup> R.AVFPSIVGRPR.H <sup>(39)</sup>	31	599.8602	2	
					<sup>(51)</sup> K.DSYVGDEAQS.K.R <sup>(61)</sup>	30	599.7679	2	
					<sup>(96)</sup> R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A <sup>(113)</sup>	65	977.5379	2	
					<sup>(148)</sup> R.TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPH	90	800.6613	4	
					AILR.L + Oxidation(M) <sup>(177)</sup>				
					<sup>(184)</sup> R.DLTDYLMK.I + Oxidation (M) <sup>(191)</sup>	30	507.7409	2	
					<sup>(184)</sup> R.DLTDYLMK.I + Oxidation (M) <sup>(191)</sup>	27	507.7479	2	
					<sup>(184)</sup> R.DLTDYLMK.I + Oxidation (M) <sup>(191)</sup>	30	508.2445	2	
					<sup>(216)</sup> K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S <sup>(238)</sup>	36	850.7325	3	
					)				
					<sup>(216)</sup> K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S <sup>(238)</sup>	38	1275.601	2	
					)		9		
<sup>(216)</sup> K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S +	68	856.0659	3						
Oxidation(M) <sup>(238)</sup>									
<sup>(216)</sup> K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S +	32	1283.600	2						
Oxidation(M) <sup>(238)</sup>		8							
<sup>(239)</sup> K.SYELPDGQVITIGNER.F <sup>(254)</sup>	101	895.9390	2						
<sup>(239)</sup> K.SYELPDGQVITIGNER.F <sup>(254)</sup>	87	895.9570	2						
<sup>(292)</sup> K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M <sup>(312)</sup>	96	1108.049	2						
		3							

					(292)K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M + Oxidation(M) <sup>(312)</sup>	125	1116.023	2
					(292)K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M + Oxidation(M) <sup>(312)</sup>	55	744.3616	3
					(292)K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M + Oxidation(M) <sup>(312)</sup>	86	1116.044	2
					(292)K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M + Oxidation(M) <sup>(312)</sup>	86	1116.536	2
					(316)K.EITALAPSTMK.I <sup>(326)</sup>	43	581.2964	2
					(316)K.EITALAPSTMK.I + Oxidation(M) <sup>(326)</sup>	24	589.3224	2
<b>Spot 49</b>	50.63/4.45	2665740	73	9	(102)K.LCYVALDFEQEMATAASSSLEK.S + Oxidation (M) <sup>(124)</sup>	73	856.0638	3
<b>Leucine zipper transcription factor-like protein 1</b>								
<b>Spot 38</b>	31.73/5.44	426249657	598	39	(31)K.TVDSCFQDLK.E <sup>(40)</sup>	25	606.7561	2
					(31)K.TVDSCFQDLK.E <sup>(40)</sup>	29	606.7843	2
					(31)K.TVDSCFQDLK.E <sup>(40)</sup>	41	606.7850	2
					(98)K.LQTDISELENR.E <sup>(108)</sup>	60	659.3026	2
					(98)K.LQTDISELENR.E <sup>(108)</sup>	57	659.3391	2
					(109)R.ELLEQVAEFK.A <sup>(119)</sup>	44	667.8471	2
					(138)K.LAPLHEGGAAELLNK.E <sup>(152)</sup>	46	511.6117	3
					(170)K.TIESQATDALDEK.S <sup>(182)</sup>	84	710.8183	2
					(170)K.TIESQATDALDEK.S <sup>(182)</sup>	79	710.8474	2
					(170)K.TIESQATDALDEK.S <sup>(182)</sup>	42	710.8480	2
					(170)K.TIESQATDALDEK.S <sup>(182)</sup>	42	711.3397	2
					(170)K.TIESQATDALDEK.S <sup>(182)</sup>	45	711.3474	2
					(188)R.ALQDLQLEHGNQK.D <sup>(200)</sup>	38	498.5953	2
					(188)R.ALQDLQLEHGNQK.D <sup>(200)</sup>	59	747.3951	3
					(188)R.ALQDLQLEHGNQK.D <sup>(200)</sup>	30	747.8861	2
					(205)K.AQDLSLENTVAALK.S <sup>(219)</sup>	39	794.3994	2
					(205)K.AQDLSLENTVAALK.S <sup>(219)</sup>	92	794.3994	2
					(205)K.AQDLSLENTVAALK.S <sup>(219)</sup>	87	794.4191	2

					(205)K.AQDLSLENTVAALK.S <sup>(219)</sup>	89	794.4203	2
					(205)K.AQDLSLENTVAALK.S <sup>(219)</sup>	42	794.9108	2
					(205)K.AQDLSLENTVAALK.S <sup>(219)</sup>	87	794.9157	2
					(235)K.SLEENLATAK.H <sup>(244)</sup>	40	538.2716	2
					(235)K.SLEENLATAK.H <sup>(244)</sup>	36	538.7797	2
					(235)K.SLEENLATAK.H <sup>(244)</sup>	40	538.7841	2
					(250)R.VQEQLSMAEK.E <sup>(259)</sup>	41	581.7948	
					(250)R.VQEQLSMAEK.E + Oxidation(M) <sup>(259)</sup>	33	589.7929	2
					(264)K.KFQQTAAFR.N <sup>(272)</sup>	53	548.8008	2
					(265)K.FQQTAAFR.N <sup>(272)</sup>	40	484.7531	2
<hr/>								
<b>Aminoacylase-1 isoform 1</b>								
<b>Spot 40</b>	39.91/5.29	426249445	417	23	(42)R.ALQLGLGCQK.V <sup>(51)</sup>	37	544.2891	2
					(42)R.ALQLGLGCQK.V <sup>(51)</sup>	37	544.7995	2
					(59)R.VVTVLTWPGTNP.K.L <sup>(71)</sup>	64	706.4056	2
					(116)K.CVSIQYLEAVR.R <sup>(126)</sup>	46	668.8368	2
					(161)K.RPEFQALR.A <sup>(168)</sup>	35	508.7876	2
					(210)R.FIEDTAAEK.L <sup>(218)</sup>	49	512.2554	2
					(222)K.VVSSILAFR.E <sup>(230)</sup>	64	496.3016	5
					(354)R.AVGVPALGFSPMNR.T + Oxidation(M) <sup>(367)</sup>	63	716.3671	2
					(387)R.GIDIYTR.L <sup>(393)</sup>	41	419.2283	2
					(387)R.GIDIYTR.L <sup>(393)</sup>	41	419.7424	2
					(394)R.LLPALASVPVLPSES. <sup>(408)</sup>	21	746.9390	2
<hr/>								
<b>NEDD8activating enzyme E1 catalytic subunit</b>								
<b>Spot 41</b>	44.41/5.29	426249295	110	4	(66)K.NLALSGFR.Q <sup>(73)</sup>	33	439.2513	2
					(378)K.SPAITATLEGK.N <sup>(388)</sup>	77	544.3061	2
<hr/>								
<b>Tubulin alpha-1B chain</b>								
<b>Spot 42</b>	51.46/5.30	426224548	604	35	(6)K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H <sup>(25)</sup>	62	1004.457	2
						6		
					(30)R.AVFVDLEPTVIDEVR.T <sup>(44)</sup>	88	851.4639	2
					(78)K.EIIDLVLDLDR.I <sup>(86)</sup>	57	543.3174	2

					(181)R.NLDIERPTYTNLNR.L <sup>(194)</sup>	36	573.6326	3
					(230)R.IHFPLATYAPVISA EK.A <sup>(245)</sup>	50	586.3274	3
					(277)K.YMACCLLYR.G <sup>(285)</sup>	44	625.2837	2
					(277)K.YMACCLLYR.G + Oxidation (M) <sup>(285)</sup>	41	633.2769	2
					(277)K.YMACCLLYR.G + Oxidation (M) <sup>(285)</sup>	19	633.7734	2
					(292)K.DVNAAIATIK.T <sup>(301)</sup>	38	508.2852	2
					(292)K.DVNAAIATIK.T <sup>(301)</sup>	50	508.2949	2
					(292)K.DVNAAIATIK.T <sup>(301)</sup>	38	508.7910	2
					(305)R.SIQFVDWCPTGFK.V <sup>(317)</sup>	50	792.8851	2
					(318)K.VGINYQPPTVVPGGDLAK.V <sup>(335)</sup>	21	912.9661	2
					(339)R.AVCMLSNTTAIAEAWAR.L + Oxidation(M) <sup>(355)</sup>	67	627.6392	3
					(339)R.AVCMLSNTTAIAEAWAR.L + Oxidation(M) <sup>(355)</sup>	118	940.9606	2
					(360)K.FDLMYAK.H <sup>(366)</sup>	24	444.2206	2
					(360)K.FDLMYAK.H + Oxidation (M) <sup>(366)</sup>	21	452.2120	2
					(360)K.FDLMYAK.H + Oxidation (M) <sup>(366)</sup>	27	452.2188	2
					(360)K.FDLMYAK.H + Oxidation (M) <sup>(366)</sup>	21	452.7125	2
<b>Tubulin beta-2A chain isoform X2</b>								
<b>Spot 43</b>	49.30/5.10	528924695	1095	41	(2)M.REIVHIQAGQCGNQIGAK.F <sup>(19)</sup>	33	660.6764	3
					(3)R.EIVHIQAGQCGNQIGAK.F <sup>(19)</sup>	42	608.3139	3
					(3)R.EIVHIQAGQCGNQIGAK.F <sup>(19)</sup>	87	911.9737	2
					(47)R.INVYYNEAAGNK.Y <sup>(58)</sup>	55	678.3377	2
					(78)R.SGPFQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK. G <sup>(103)</sup>	72	933.4539	3
					(217)K.LTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLR. F <sup>(241)</sup>	95	903.4442	3
					(217)K.LTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLR. F + Oxidation (M) <sup>(241)</sup>	56	908.7835	3
					(217)K.LTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLR. F + Oxidation (M) <sup>(241)</sup>	79	908.7881	3

(242)R.FPGQLNADLR.K <sup>(251)</sup>	98	565.7681	2
(242)R.FPGQLNADLR.K <sup>(251)</sup>	60	565.8038	2
(242)R.FPGQLNADLR.K <sup>(251)</sup>	98	566.1782	2
(242)R.FPGQLNADLR.K <sup>(251)</sup>	60	566.2977	2
(252)R.KLAVNMVPPFR.L <sup>(262)</sup>	44	636.3718	2
(252)R.KLAVNMVPPFR.L + Oxidation(M) <sup>(262)</sup>	71	644.3616	3
(253)K.LAVNMVPPFR.L <sup>(262)</sup>	84	572.3226	2
(253)K.LAVNMVPPFR.L + Oxidation(M) <sup>(262)</sup>	83	580.2984	2
(263)R.LHFFMPGFAPLTSR.G + Oxidation(M) <sup>(276)</sup>	48	818.4096	2
(263)R.LHFFMPGFAPLTSR.G + Oxidation(M) <sup>(276)</sup>	48	546.2828	3
(298)K.NMMAACDPR.H <sup>(306)</sup>	36	533.2215	2
(310)R.YLTVA AIFR.G <sup>(318)</sup>	68	527.3110	2
(325)K.EVDEQMLNVQNK.N <sup>(336)</sup>	55	723.8527	2
(325)K.EVDEQMLNVQNK.N + Oxidation(M) <sup>(336)</sup>	49	731.8479	2
(337)K.NSSYFVEWIPNNVK.T <sup>(350)</sup>	39	848.9067	2
(351)K.TAVCDIPPR.G <sup>(359)</sup>	23	514.7658	2
(351)K.TAVCDIPPR.G <sup>(359)</sup>	65	514.7661	2
(351)K.TAVCDIPPR.G <sup>(359)</sup>	54	514.7664	2
(351)K.TAVCDIPPR.G <sup>(359)</sup>	50	514.7667	2
(351)K.TAVCDIPPR.G <sup>(359)</sup>	54	515.2647	2
(363)K.MSATFIGNSTAIQELFK.R <sup>(379)</sup>	65	929.4819	2
(363)K.MSATFIGNSTAIQELFK.R + Oxidation(M) <sup>(379)</sup>	96	937.4821	2
(363)K.MSATFIGNSTAIQELFK.R + Oxidation(M) <sup>(379)</sup>	95	937.9699	2
(381)R.ISEQFTAMFR.R <sup>(390)</sup>	95	615.2936	3
(381)R.ISEQFTAMFR.R + Oxidation M) <sup>(390)</sup>	35	623.2929	3
(381)R.ISEQFTAMFR.R + Oxidation M) <sup>(390)</sup>	65	623.2929	3

					(381)R.ISEQFTAMFR.R + Oxidation M) <sup>(390)</sup>	54	623.3042	3
					(381)R.ISEQFTAMFR.R + Oxidation M) <sup>(390)</sup>	37	623.3253	2
<b>Protein TSSC1</b>								
<b>Spot 44</b>	48.84/4.87	426222084	275	19	(17)R.ALTPQTAETDAIR.F <sup>(29)</sup>	42	693.8683	2
					(78)R.GVLATCYSQAADSK.V <sup>(91)</sup>	73	735.8535	2
					(92)K.VVTCAAVWR.M <sup>(100)</sup>	51	531.2849	2
					(242)K.QYYLASCDDCK.V <sup>(253)</sup>	65	740.3012	2
					(281)R.YNHSHDQLVLTGSSDSR.V <sup>(297)</sup>	44	639.3035	3
<b>Serpin A3-1-like, partial</b>								
<b>Spot 46</b>	42.40/4.73	426259137	71	6	(122)K.IFADADLSGITGTR.D <sup>(135)</sup>	71	718.8793	2
<b>Spot 59</b>	24.20/4.89	426259137	83	6	(122)K.IFADADLSGITGTR.D <sup>(135)</sup>	38	718.8770	2
<b>Spot 61</b>	27.33/4.84	426259137	177	15	(94)K.IHELK.LPK.F <sup>(101)</sup>	19	506.7961	2
					(122)K.IFADADLSGITGTR.D <sup>(135)</sup>	108	718.8767	2
					(188)K.DTQSIIFLGR.V <sup>(197)</sup>	49	561.3160	2
<b>Serpin A3-5-like, partial</b>								
<b>Spot 47</b>	54.95/4.46	426258796	213	28	(2)R.WQIPFDPK.R <sup>(9)</sup>	22	515.7680	
					(10)K.RTEQAEFHVSK.N <sup>(20)</sup>	42	444.5623	3
					(75)K.LIPETLTR.W <sup>(82)</sup>	37	471.7867	2
					(91)R.LIHTLSLPK.F <sup>(99)</sup>	24	511.3167	2
					(91)R.LIHTLSLPK.F <sup>(99)</sup>	24	511.8227	2
					(176)R.FNRPFLLIAAVLK.D <sup>(187)</sup>	32	463.6191	3
					(188)K.DTQSIIFLGR.V <sup>(197)</sup>	56	575.3193	2
<b>Alpha-S1-casein precursor</b>								
<b>Spot 48</b>	56.12/4.39	30794348	91	12	(23)K.HQGLPQEVLENLLR.F <sup>(37)</sup>	54	587.3215	3
					(38)R.FFVAPFPEVFGK.E <sup>(49)</sup>	37	692.8731	2
<b>Spot 79</b>	12.00/4.10	30794348	77	12	(23)K.HQGLPQEVLENLLR.F <sup>(37)</sup>	40	587.3239	3
					(38)R.FFVAPFPEVFGK.E <sup>(49)</sup>	37	692.8740	2
<b>Clusterin isoform 1</b>								
<b>Spot 50</b>	38.27/4.43	426220555	460	18	(73)K.TQIEQTNEER.K <sup>(92)</sup>	40	624.2997	2
					(63)K.LLLSSLEAK.K <sup>(72)</sup>	59	551.8240	2

Spot 51	38.00/4.50	426220555	492	18	<sup>(63)</sup> K.LLLSSLEEAK.K <sup>(72)</sup>	70	615.8720	2
					<sup>(153)</sup> R.IDSLMENDR.E <sup>(161)</sup>	59	546.7556	2
					<sup>(162)</sup> R.EQSHVMDVMEDSFTR.A +2	53	614.9281	3
					Oxidation(M) <sup>(176)</sup>			
					<sup>(162)</sup> R.EQSHVMDVMEDSFTR.A +2	24	921.8933	2
					Oxidation(M) <sup>(176)</sup>			
					<sup>(177)</sup> R.ASSIMDELFQDR.F + Oxidation(M) <sup>(188)</sup>	69	714.3311	2
					<sup>(177)</sup> R.ASSIMDELFQDR.F + Oxidation(M) <sup>(188)</sup>	102	714.3312	2
					<sup>(193)</sup> R.RPQDTQYYSPFSSFPR.G <sup>(208)</sup>	57	659.3166	3
					<sup>(193)</sup> R.RPQDTQYYSPFSSFPR.G <sup>(208)</sup>	47	988.4744	3
					<sup>(193)</sup> R.RPQDTQYYSPFSSFPR.G <sup>(208)</sup>	36	659.6439	3
					<sup>(209)</sup> R.GSLFFNPK.S <sup>(216)</sup>	24	455.2467	2
					<sup>(52)</sup> K.TQIEQTNEER.K <sup>(61)</sup>	69	624.3005	2
					<sup>(63)</sup> K.LLLSSLEEAK.K <sup>(72)</sup>	42	551.8242	2
					<sup>(63)</sup> K.LLLSSLEEAKK.K <sup>(73)</sup>	51	410.9126	3
					<sup>(63)</sup> K.LLLSSLEEAKK.K <sup>(73)</sup>	70	615.8683	3
					<sup>(153)</sup> R.IDSLMENDR.E <sup>(161)</sup>	66	546.7557	2
					<sup>(153)</sup> R.IDSLMENDR.E + Oxidation (M) <sup>(161)</sup>	65	554.7529	2
					<sup>(162)</sup> R.EQSHVMDVMEDSFTR.A +	37	609.5953	3
					Oxidation(M) <sup>(176)</sup>			
					<sup>(162)</sup> R.EQSHVMDVMEDSFTR.A +	38	609.5954	3
					Oxidation(M) <sup>(176)</sup>			
					<sup>(162)</sup> R.EQSHVMDVMEDSFTR.A +2	32	614.9264	3
Oxidation(M) <sup>(176)</sup>								
<sup>(162)</sup> R.EQSHVMDVMEDSFTR.A +2	66	614.9274	3					
Oxidation(M) <sup>(176)</sup>								
<sup>(162)</sup> R.EQSHVMDVMEDSFTR.A +2	55	921.8913	2					
Oxidation(M) <sup>(176)</sup>								
<sup>(177)</sup> R.ASSIMDELFQDR.F <sup>(188)</sup>	94	706.3337	2					
<sup>(177)</sup> R.ASSIMDELFQDR.F + Oxidation(M) <sup>(188)</sup>	43	714.3258	2					
<sup>(177)</sup> R.ASSIMDELFQDR.F + Oxidation(M) <sup>(188)</sup>	89	714.3258	2					

Spot 52	35.52/4.35	426220555	609	30	(177)R.ASSIMDELQDR.F + Oxidation(M) <sup>(188)</sup>	68	714.3312	2
					(193)R.RPQDTQYYSPFSSFP.R.G <sup>(208)</sup>	66	659.3160	2
					(193)R.RPQDTQYYSPFSSFP.R.G <sup>(208)</sup>	33	659.6446	3
					(209)R.GSLFFNPK.S <sup>(216)</sup>	25	455.2467	2
					(63)K.LLLSSLEEAK.K <sup>(72)</sup>	66	551.8251	2
					(63)K.LLLSSLEEAKK.K <sup>(73)</sup>	57	410.9156	3
					(63)K.LLLSSLEEAKK.K <sup>(73)</sup>	51	615.8732	3
					(177)R.ASSIMDELQDR.F <sup>(188)</sup>	38	706.3335	2
					(193)R.RPQDTQYYSPFSSFP.R.G <sup>(208)</sup>	58	659.3158	3
					(247)R.QAQQAMDAHLQR.T <sup>(258)</sup>	42	698.3287	2
					(247)R.QAQQAMDAHLQR.T <sup>(258)</sup>	38	698.8218	2
					(247)R.QAQQAMDAHLQR.T <sup>(258)</sup>	60	466.2320	3
					(247)R.QAQQAMDAHLQR.T + Oxidation(M) <sup>(258)</sup>	35	706.3271	2
					(247)R.QAQQAMDAHLQR.T + Oxidation(M) <sup>(258)</sup>	32	706.8190	2
					(259)R.TPYHFPVTEFTENND.R.T <sup>(274)</sup>	45	656.3049	3
					(297)K.CQEILEVDCSASSPTQTLLR.Q <sup>(316)</sup>	115	1154.059	2
							3	
					(332)R.LYDQLLQSYQQK.M <sup>(343)</sup>	45	763.8926	2
					(332)R.LYDQLLQSYQQK.M <sup>(343)</sup>	63	763.9016	2
					(344)K.MLDTSTLLK.Q <sup>(352)</sup>	32	511.2843	2
					(344)K.MLDTSTLLK.Q + Oxidation (M) <sup>(352)</sup>	19	519.2753	2
(344)K.MLDTSTLLK.Q + Oxidation (M) <sup>(352)</sup>	53	519.2833	2					
(344)K.MLDTSTLLK.Q + Oxidation (M) <sup>(352)</sup>	19	519.7816	2					
(401)K.LFNSFPITVTVPQEVSSPNFMENVAEK .A + Oxidation(M) <sup>(427)</sup>	59	1014.174	3					
		8						
Spot 53	34.85/4.43	426220555	291	21	(193)R.RPQDTQYYSPFSSFP.R.G <sup>(208)</sup>	66	659.3161	3
					(247)R.QAQQAMDAHLQR.T <sup>(258)</sup>	28	698.3294	2
					(297)K.CQEILEVDCSASSPTQTLLR.Q <sup>(316)</sup>	86	1154.060	2
							5	



					(332)R.LYDQLLQSYQQK.M <sup>(343)</sup>	53	763.8988	2
					(332)R.LYDQLLQSYQQK.M <sup>(343)</sup>	46	763.9008	2
					(344)K.MLDTSTLLK.Q <sup>(352)</sup>	31	511.2873	2
					(344)K.MLDTSTLLK.Q + Oxidation (M) <sup>(352)</sup>	42	519.2745	2
					(344)K.MLDTSTLLK.Q + Oxidation (M) <sup>(352)</sup>	42	519.7811	2
					(401)K.LFNSFPITVTVPQEVSSPNFMENVAEK	19	1014.176	3
					.A + Oxidation(M) <sup>(427)</sup>		1	
<b>Spot 54</b>	34.25/4.52	426220555	127	7	(247)R.QAQQAMDAHLQR.T <sup>(258)</sup>	28	698.3306	2
					(332)R.LYDQLLQSYQQK.M <sup>(343)</sup>	53	763.9011	2
					(332)R.LYDQLLQSYQQK.M <sup>(343)</sup>	43	763.9020	2
					(344)K.MLDTSTLLK.Q <sup>(352)</sup>	33	511.2852	2
					(344)K.MLDTSTLLK.Q + Oxidation(M) <sup>(352)</sup>	46	519.2810	2
<b>14-3-3 protein epsilon</b>								
<b>Spot 55</b>	26.93/4.64	426237278	372	38	(8)K.VAGMDVELTVEER.N + Oxidation (M) <sup>(20)</sup>	74	732.3607	2
					(21)R.NLLSVAYK.N <sup>(28)</sup>	31	454.2677	2
					(73)K.LICCDILDVLDK.H <sup>(84)</sup>	68	738.8805	2
					(109)R.YLAEFATGNDR.K <sup>(119)</sup>	70	628.8021	2
					(132)K.AASDIAMTELPPTHPIR.L + Oxidation(M) <sup>(148)</sup>	45	612.6508	3
					(175)K.AAFDDAIAELDTLSEESYK.D <sup>(193)</sup>	33	1044.496	2
					(194)K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(203)</sup>	55	603.3348	2
<b>Prostaglandin-H2 D-isomerase precursor</b>								
<b>Spot 56</b>	26.18/4.73	57164293	178	14	(138)R.GPGPDSLMATLYSR.T <sup>(151)</sup>	104	732.3609	2
					(138)R.GPGPDSLMATLYSR.T <sup>(151)</sup>	104	732.8616	2
					(138)R.GPGPDSLMATLYSR.T + Oxidation(M) <sup>(151)</sup>	84	740.8651	2
					(169)R.SLGFTEEGIVFLPK.T <sup>(182)</sup>	74	768.9226	2
<b>Spot 60</b>	24.87/4.90	57164293	97	7	(138)R.GPGPDSLMATLYSR.T +	97	740.8641	2

					Oxidation(M) <sup>(151)</sup>				
<b>14-3-3 protein eta</b>									
<b>Spot 58</b>	24.39/4.82	426247555	134	16	<sup>(17)</sup> R.NLLSVAYK.N <sup>(24)</sup>	34	454.2505	2	
					<sup>(17)</sup> R.NLLSVAYK.N <sup>(24)</sup>	28	454.2690	2	
					<sup>(118)</sup> K.SSVVEASEAAYKEAFEISK.E <sup>(136)</sup>	47	1023.017	2	
						7			
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D <sup>(201)</sup>	44	595.3337	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D <sup>(201)</sup>	48	595.3378	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	54	603.3149	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	49	603.3352	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	53	603.3356	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	53	603.3359	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	53	603.8284	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	49	603.8341	2	
<b>Spot 59</b>	24.20/4.89	426247555	203	17	<sup>(17)</sup> R.NLLSVAYK.N <sup>(24)</sup>	34	454.2554	2	
					<sup>(17)</sup> R.NLLSVAYK.N <sup>(24)</sup>	31	454.2706	2	
					<sup>(17)</sup> R.NLLSVAYK.N <sup>(24)</sup>	31	454.7605	2	
					<sup>(36)</sup> R.VISSIEQK.T <sup>(43)</sup>	37	454.2632	2	
					<sup>(118)</sup> K.SSVVEASEAAYK.E <sup>(129)</sup>	78	620.8093	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D <sup>(201)</sup>	50	595.3370	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D <sup>(201)</sup>	42	595.3380	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	51	603.3332	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	54	603.3334	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	48	603.3334	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	38	603.3350	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	54	603.8325	2	
					<sup>(192)</sup> K.DSTLIMQLLR.D + Oxidation(M) <sup>(201)</sup>	48	603.8325	2	
<b>Enolase-phosphatase E1</b>									
<b>Spot 62</b>	28.57/5.10	426231941	433	24	<sup>(129)</sup> K.AEFFEDVVP AVR.K <sup>(140)</sup>	25	689.8480	2	
					<sup>(129)</sup> K.AEFFEDVVP AVR.K <sup>(140)</sup>	51	689.8480	2	
					<sup>(149)</sup> K.VYVYSSGSVEAQK.L <sup>(161)</sup>	72	708.8575	2	

					(149)K.VYVYSSGSVEAQK.L <sup>(161)</sup>	39	708.8587	2	
					(149)K.VYVYSSGSVEAQK.L <sup>(161)</sup>	72	708.8596	2	
					(195)R.KIASSIGCSTNNILFLTDVSR.E <sup>(215)</sup>	86	766.0728	3	
					(196)K.IASSIGCSTNNILFLTDVSR.E <sup>(215)</sup>	156	1084.565	2	
						0			
					(244)K.THFSLITSFSELCLPSSA.- <sup>(261)</sup>	67	998.9985	2	
<hr/>									
<b>Ran-specific GTPase-activating protein</b>									
<b>Spot 63</b>	26.00/5.08	426247991	272	30	(57)K.TLEEDDEELFK.M <sup>(67)</sup>	80	691.3263	2	
					(75)R.FASENDLPEWK.E <sup>(85)</sup>	64	668.3142	2	
					(115)K.ICANHYYITPMELKPNAGSDR.A +2	61	817.3820	3	
					Oxidation(M) <sup>(135)</sup>				
					(115)K.ICANHYYITPMELKPNAGSDR.A +2	27	817.7095	3	
					Oxidation(M) <sup>(135)</sup>				
					(136)R.AWVWNTHADFADECPK.Q <sup>(151)</sup>	32	649.6233	3	
					(159)R.FLNAENAQK.F <sup>(167)</sup>	35	517.7701	2	
<hr/>									
<b>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3-like</b>									
<b>Spot 64</b>	22.93/5.01	426255656	394	27	(6)R.WLPLEANPEVTNQFLK.Q <sup>(21)</sup>	27	950.0118	2	
					(75)K.SRGQDVTSSVYFMK.Q +	36	540.9268	3	
					Oxidation(M) <sup>(88)</sup>				
					(77)R.GQDVTSSVYFMK.Q <sup>(88)</sup>	60	681.3276	2	
					(77)R.GQDVTSSVYFMK.Q + Oxidation(M) <sup>(88)</sup>	67	689.3254	2	
					(77)K.MHFESGSTLK.K <sup>(88)</sup>	25	568.7780	2	
					(111)K.MHFESGSTLK.K + Oxidation(M) <sup>(120)</sup>	35	576.7754	2	
					(121)K.KFLEESASMSPEER.A +	64	552.5924	3	
					Oxidation(M) <sup>(134)</sup>				
					(122)K.FLEESASMSPEER.A <sup>(134)</sup>	108	756.3418	2	
					(122)K.FLEESASMSPEER.A + Oxidation(M) <sup>(134)</sup>	57	764.3306	2	
					(122)K.FLEESASMSPEER.A + Oxidation(M) <sup>(134)</sup>	88	764.3395	2	
					(137)R.YLENYDAIR.V <sup>(145)</sup>	48	578.7529	2	
					(137)R.YLENYDAIR.V <sup>(145)</sup>	57	578.7886	2	
					(137)R.YLENYDAIR.V <sup>(145)</sup>	48	579.1665	2	

					(137)R.YLENYDAIR.V <sup>(145)</sup>	31	579.2816	2	
<b>Translationally-controlled tumor protein</b>									
<b>Spot 65</b>	20.46/5.00	62177164	136	22	(22)R.EVADGLCLEVEGK.M <sup>(34)</sup>	34	709.8499	2	
					(111)R.VKPFMTGAAEQIK.H <sup>(123)</sup>	38	710.3899	2	
					(111)R.VKPFMTGAAEQIK.H + Oxidation(M) <sup>(123)</sup>	58	479.2566	3	
					(111)R.VKPFMTGAAEQIK.H + Oxidation(M) <sup>(123)</sup>	76	718.3861	2	
					(153)R.EDGVTPYMIFFK.D + Oxidation(M) <sup>(164)</sup>	28	731.8537	2	
<b>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</b>									
<b>Spot 66</b>	24.00/5.30	426241352	278	25	(51)K.YKEALLGR.V <sup>(58)</sup>	51	475.2792	2	
					(59)R.VVVSADPNVNVVTR.L <sup>(74)</sup>	29	832.9755	2	
					(139)K.IDKTDYMGVGSYGPR.A <sup>(152)</sup>	59	534.5935	3	
					(139)K.IDKTDYMGVGSYGPR.A <sup>(152)</sup>	94	801.3890	2	
					(139)K.IDKTDYMGVGSYGPR.A + Oxidation(M) <sup>(152)</sup>	81	539.9253	3	
					(139)K.IDKTDYMGVGSYGPR.A + Oxidation(M) <sup>(152)</sup>	91	809.3881	2	
					(142)K.TDYMGVGSYGPR.A <sup>(152)</sup>	55	623.2819	2	
					(142)K.TDYMGVGSYGPR.A + Oxidation(M) <sup>(152)</sup>	26	631.2615	2	
					(142)K.TDYMGVGSYGPR.A + Oxidation(M) <sup>(152)</sup>	58	631.2615	2	
					(153)R.AEEYEFLTPMEEAPK.G <sup>(167)</sup>	27	892.4155	2	
					(153)R.AEEYEFLTPMEEAPK.G + Oxidation(M) <sup>(167)</sup>	44	900.4098	2	
					(153)R.AEEYEFLTPMEEAPK.G + Oxidation(M) <sup>(167)</sup>	25	900.4100	2	
<b>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 isoform 1</b>									
<b>Spot 67</b>	22.22/5.31	426231623	275	29	(20)R.LGVAGQWR.F <sup>(27)</sup>	61	443.7476	2	
					(106)K.LEFEDGSVLK.Q <sup>(115)</sup>	49	568.7983	2	
					(136)K.NEAIQAAHDAVAQEGQCR.V <sup>(153)</sup>	40	656.6371	3	
					(136)K.NEAIQAAHDAVAQEGQCR.V <sup>(153)</sup>	46	656.6384	3	

					(136)K.NEAIQAAHDAVAQEGQCR.V <sup>(153)</sup>	46	656.9580	3
					(179)R.MPPFVNHGTSSSEDSLLQDAAK.V <sup>(199)</sup>	31	748.6943	3
					(179)R.MPPFVNHGTSSSEDSLLQDAAK.V + Oxidation(M) <sup>(199)</sup>	85	754.0248	3
					(214)R.FSAVALCK.A <sup>(221)</sup>	37	448.2340	2
<b>Peroxiredoxin-2</b>								
<b>Spot 68</b>	19.10/5.30	261244978	479	27	(92)R.KEGGLGPLNIPLLADVTR.K <sup>(109)</sup>	58	621.6969	3
					(93)K.EGGLGPLNIPLLADVTR.K <sup>(109)</sup>	56	867.9956	2
					(110)R.KLSSDYGVLK.E <sup>(119)</sup>	56	555.3064	2
					(111)R.KLSSDYGVLK.E <sup>(119)</sup>	46	491.2577	2
					(111)K.LSSDYGVLKEDEGVAYR.G <sup>(127)</sup>	113	634.3168	3
					(120)K.EDEGVAYR.G <sup>(127)</sup>	49	469.7164	2
					(128)R.GLFVIDGK.G <sup>(135)</sup>	40	424.7463	2
					(140)R.QVTVNDLPVGR.S <sup>(150)</sup>	64	599.2869	2
					(140)R.QVTVNDLPVGR.S <sup>(150)</sup>	50	599.3378	2
					(140)R.QVTVNDLPVGR.S <sup>(150)</sup>	50	599.8286	2
<b>Proteasome subunit beta type-4</b>								
<b>Spot 70</b>	21.60/5.67	426216582	77	9	(46)R.TQNPMVTGTSVLGLK.F + Oxidation(M) <sup>(60)</sup>	36	781.4229	2
					(232)R.FQIATVTEK.G <sup>(240)</sup>	41	518.7910	2
					(232)R.FQIATVTEK.G <sup>(240)</sup>	40	518.7910	2
<b>Pseudouridine-5'-monophosphatase</b>								
<b>Spot 71</b>	20.72/5.57	426257939	117	6	(187)K.ALEAAQLIR.D <sup>(195)</sup>	73	492.7977	2
					(217)K.EVFPTAALMPGVEK.L + Oxidation(M) <sup>(230)</sup>	43	752.8953	2
<b>Glutathione S-transferase Mu 5</b>								
<b>Spot 72</b>	22.79/6.67	426216186	439	37	(6)K.SMVLGYWDIR.G <sup>(15)</sup>	35	620.3184	2
					(6)K.SMVLGYWDIR.G + Oxidation(M) <sup>(15)</sup>	62	628.3102	2
					(37)R.YTCGEAPDYDK.S <sup>(47)</sup>	56	659.7689	2
					(48)K.SQWLDVK.F <sup>(54)</sup>	36	875.4545	1
					(74)R.LTQSNAILR.Y <sup>(82)</sup>	84	508.2985	2

					(74)R.LTQSNAILR.Y <sup>(82)</sup>	84	508.7924	2
					(113)R.MQLAQLCYNPDHEK.L <sup>(126)</sup>	23	582.9384	3
					(113)R.MQLAQLCYNPDHEK.L + Oxidation(M) <sup>(126)</sup>	25	588.2694	3
					(141)K.QFSLFLGK.Y <sup>(148)</sup>	30	470.2592	2
					(149)K.YSWFAGEK.L <sup>(156)</sup>	34	494.2224	2
					(178)K.CLDEFPNLK.A <sup>(186)</sup>	33	568.2684	2
					(198)K.IATYMQSDR.F <sup>(206)</sup>	80	542.7614	2
					(198)K.IATYMQSDR.F + Oxidation(M) <sup>(206)</sup>	60	550.7581	2
					(198)K.IATYMQSDR.F + Oxidation(M) <sup>(206)</sup>	80	550.7591	2
<b>Superoxide dismutase [Cu-Zn]-like</b>								
<b>Spot 74</b>	12.19/6.71	426237454	144	21	(11)K.GDGPVQGTIR.F <sup>(20)</sup>	37	500.2660	2
					(79)R.HVGD LGNVK.A <sup>(87)</sup>	47	469.7578	2
					(115)R.TMVVHEKPDDLGR.G + Oxidation(M) <sup>(127)</sup>	60	504.9228	3
<b>Hemoglobin subunit beta</b>								
<b>Spot 75</b>	10.86/6.91	164448674	166	30	(8)K.AAVTGFVWGK.V <sup>(16)</sup>	40	468.7524	2
					(30)R.LLVVYPWTQR.F <sup>(39)</sup>	46	637.8709	2
					(82)K.GTFAQLSELHCDK.L <sup>(94)</sup>	17	753.3629	2
					(104)R.LLGNVLLVVVLAR.H <sup>(115)</sup>	62	633.4227	2
<b>Transthyretin precursor</b>								
<b>Spot 76</b>	10.26/6.20	57526651	457	46	(42)R.GSPAANVGVK.V <sup>(51)</sup>	36	450.2531	2
					(55)K.KAADETWE PFASGK.T <sup>(68)</sup>	43	512.9157	3
					(55)K.KAADETWE PFASGK.T <sup>(68)</sup>	93	768.8746	2
					(56)K.AADETWE PFASGK.T <sup>(68)</sup>	43	704.8073	2
					(56)K.AADETWE PFASGK.T <sup>(68)</sup>	75	704.8166	2
					(69)K.TSDSGELHGLTTEDK.F <sup>(83)</sup>	55	530.5770	3
					(69)K.TSDSGELHGLTTEDK.F <sup>(83)</sup>	33	530.5814	3
					(69)K.TSDSGELHGLTTEDK.F <sup>(83)</sup>	121	795.3693	2
					(69)K.TSDSGELHGLTTEDK.F <sup>(83)</sup>	57	795.3726	2
					(84)K.FVEGLYK.V <sup>(90)</sup>	23	428.2345	2

					(84)K.FVEGLYK.V <sup>(90)</sup>	23	428.7616	2
					(124)R.HYTIAALLSPYSYSTTALVSSPK.E <sup>(146)</sup>	108	824.1040	3
<b>Retinol-binding protein 1</b>								
<b>Spot 77</b>	9.44/5.27	426218222	386	54	(2)M.PVDFTGYWK.M <sup>(10)</sup>	45	556.7759	2
					(11)K.MLANENFEEYLR.A + Oxidation(M) <sup>(22)</sup>	71	772.8601	2
					(23)R.ALDVNVALR.K <sup>(31)</sup>	41	485.7893	2
					(23)R.ALDVNVALR.K <sup>(31)</sup>	49	485.7894	2
					(33)K.IANLLKPKD.E <sup>(41)</sup>	43	506.3170	2
					(42)K.EIVQEGDHMIIR.T <sup>(53)</sup>	50	720.3743	2
					(42)K.EIVQEGDHMIIR.T + Oxidation(M) <sup>(53)</sup>	57	485.9148	3
					(42)K.EIVQEGDHMIIR.T + Oxidation(M) <sup>(53)</sup>	80	728.3705	2
					(60)R.NYIMDFQVGK.E <sup>(69)</sup>	30	607.8005	2
					(60)R.NYIMDFQVGK.E + Oxidation(M) <sup>(69)</sup>	33	615.7996	2
					(60)R.NYIMDFQVGK.E + Oxidation(M) <sup>(69)</sup>	36	616.2911	2
					(70)K.EFEEDLTGIDDR.K <sup>(81)</sup>	65	719.8248	2
<b>Thioredoxin</b>								
<b>Spot 78</b>	8.67/5.26	57164261	231	42	(9)K.YAFQEALNSAGEK.L <sup>(21)</sup>	32	714.3292	2
					(9)K.YAFQEALNSAGEK.L <sup>(21)</sup>	97	714.3292	2
					(9)K.YAFQEALNSAGEK.L <sup>(21)</sup>	26	714.8399	2
					(9)K.YAFQEALNSAGEK.L <sup>(21)</sup>	48	714.8400	2
					(37)K.MIKPFFHSLSEK.Y + Oxidation(M) <sup>(48)</sup>	45	493.9281	3
					(73)K.CMPTFQFFK.K + Oxidation(M) <sup>(81)</sup>	30	611.2750	2
					(73)K.CMPTFQFFK.K + Oxidation(M) <sup>(81)</sup>	21	611.7705	3
					(95)K.EKLEATINELI.- <sup>(105)</sup>	58	636.8593	2
<b>Cytosolic prostaglandin E synthase</b>								
<b>Spot 80</b>	16.38/4.35	51493666	198	25	(36)K.LTFSCLOGGSDNFK.H <sup>(48)</sup>	21	723.3106	2
					(36)K.LTFSCLOGGSDNFK.H <sup>(48)</sup>	93	723.3106	2
					(72)R.SILCCLR.K <sup>(78)</sup>	31	461.2275	2
					(80)K.GESGQSWPR.L <sup>(88)</sup>	40	502.2374	2
					(96)K.LNWLSVDFNNWK.D <sup>(107)</sup>	35	768.3914	2