



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

MAYRA BEZERRA VETTORAZZI

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SÊMEN DE ARIACÓ (*Lutjanus synagris*,
Perciformes) TRATADOS COM GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

FORTALEZA

2018

VEKTORAZZI PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SÊMEN DE ARIACCÓ (*Lutjanus synagris*, Perciformes)
TRATADOS COM GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

2018

V.1

MAYRA BEZERRA VETTORAZZI

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SÊMEN DE ARIACÓ (*Lutjanus synagris*, Perciformes) TRATADOS COM GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

Tese de doutorado submetida à coordenação do programa de pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Manejo de ecossistemas para a produção biológica

Orientador: Prof. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, Ph.D

FORTALEZA

2018

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

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

- V659p Vettorazzi, Mayra Bezerra.
PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SÊMEN DE ARIACÓ (*Lutjanus synagris*, Perciformes)
TRATADOS COM GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA (hCG) / Mayra Bezerra Vettorazzi. –
2018.
159 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Mameel Antonio de Andrade Furtado Neto.

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

1. proteoma. 2. eletroforese. 3. morfologia espermática. 4. peixe. 5. hCG. I. Título.

CDD 551.46

MAYRA BEZERRA VETTORAZZI

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SÊMEN DE ARIACÓ (*Lutjanus synagris*, Perciformes) TRATADOS COM GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

Tese de doutorado submetida à coordenação do programa de pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Manejo de ecossistemas para a produção biológica.

Orientador: Prof. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, Ph.D.

Aprovada em:

____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.: Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, Ph.D. (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni, Membro Interno

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. José Renato de Oliveira César

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Rossi Lelis Muniz Souza

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Márcio Alves Bezerra

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE

Aos meus pais, Ana e Antonio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, pela educação, incentivo e apoio. Pelos anos que vivemos juntos, nos quais pude reimprimir sua dignidade, honestidade, autenticidade e paixão pela vida;

À minha grande família que sempre proporcionou um ambiente agradável e adequado à realização deste trabalho;

Aos meus orientadores, professor Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, pela oportunidade de trabalho;

Ao meu co-orientador, professor Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura pela acolhida e oportunidade da realização deste trabalho no Laboratório de Fisiologia Animal - LFA, do departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição efetiva na dinâmica do laboratório e suas preciosíssimas sugestões;

À toda equipe do LFA e em especial à Dr. Paula Rodriguez Villamil e professor Dr. Jorge André Matias Martins pela contribuição em todas as fases de execução deste trabalho;

Ao amigo e colaborador Dr. Rossi Lelis Muniz, pelo apoio, intelectual e emocional, tão necessário nos momentos difíceis.

À equipe do UPPMAR pela disponibilidade de apoio nas práticas, e pelo bom humor nas horas tensas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – CAPES pelo apoio financeiro, na concessão da bolsa;

RESUMO

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) melhora a desova em peixes vermelhos, especialmente se considerado a produção e qualidade de ovos e a taxa de eclosão. O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros seminais e o proteoma do sêmen de ariacó submetidos à terapia hormonal com hCG. As proteínas foram analisadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida SDS-PAGE combinada com identificação por espectrometria de massas ESI-Q-TOF. Esta é a primeira análise do proteoma do sêmen de ariacó, e detectou 32 tipos de banda, com um total de 71 proteínas identificadas. *Creatine kinase*, *tubulina*, *heat shock cognate 71*, *heat shock protein 60*, *peroxiredoxin 1 e 3* estiveram entre as proteínas de maior abundância no sêmen de ariacó. *PSP-I*, *HSP90AA1*, *ubiquitin carboxi-terminal hydrolase 5* e *transferrin* foram diferencialmente expressas no sêmen de peixes tratados com hCG. O hCG aumentou a concentração espermática, o número de espermatozoides morfológicamente normais, a concentração de proteínas solúveis e cinco diferentes bandas no sêmen de ariacó. A maioria das proteínas do sêmen de ariacó apresenta atividade ligante e catalisadora (hidrolases e catalases). As proteínas seminais que foram diferencialmente expressas após o tratamento com hCG estão envolvidas potencialmente com estocagem de ATP, na composição celular e na proteção espermática contra oxidação. Esta é a primeira descrição dos parâmetros seminais e proteoma do sêmen de ariacó após o tratamento com hCG. Estas descobertas abrem novas oportunidades para pesquisas que aprimorem tecnologias para a reprodução de peixes e preservação de espermatozoides.

Palavras-chave: *proteoma, eletroforese, morfologia espermática, peixe, plasma seminal, hCG*

ABSTRACT

Human Chorionic Gonadotropine (hCG) enhances spawning in snappers, especially based on the production and quality of eggs and hatching success rates. The objective of the present study was to evaluate sperm parameters and semen proteome from lane snapper males subjected to hormonal therapy with hCG. Proteins were analyzed by SDS-PAGE prefractionation combined with identification by ESI-Q-TOF mass spectrometry. Using this approach, we detected 30 band types with a total of 71 identified proteins in lane snapper semen. Creatine kinase, tubulin, heat shock cognate 71, heat shock protein 60, peroxiredoxin 1 and 3 were present in high abundance in semen of lane snapper. PSP-I, HSP90AA1, ubiquitin carboxi-terminal hydrolase 5 and transferrin were differentially expressed in semen from hCH-treated fish. hCG increased sperm concentration, morphologically normal sperm, soluble protein concentration and five different bands in lane snapper semen. Most of lane snapper semen proteins present binding and catalytic activity (hydrolases and transferases). Semen proteins that were over expressed after hCG treatment are potentially involved in ATP storage, cellular composition and sperm protection. This is the first description of semen parameters and proteome of lane snapper semen after hCG treatment. Such discoveries open new opportunities for research to improve technologies for fish reproduction and preservation.

Key-words: *proteome, electrophoresis, sperm morphology, fish, seminal plasma, hCG*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração representativa de exemplares da família Lutjanidae. Adaptado de FAO (2002).....	18
Figura 2 - <i>Lutjanus synagris</i> , o ariacó. Exemplar utilizado no presente estudo.....	19
Figura 3 - Ocorrência do ariacó (<i>L. synagris</i>) indicada em vermelho.....	20
Figura 4 - Esquema ilustrativo da sequência de estímulos hormonais que precede a formação dos gametas em teleósteos.....	26
Figura 5 - Esquema ilustrativo das condições gerais de osmolaridade requeridas para a ativação da motilidade espermática em peixes marinhos ou dulcícolas.....	30
Figura 6 - Desenho esquemático de um espermatozoide de peixe.....	32
Figura 7 - Vista aérea do CEAC. (A) UPPMAR; (B) Estuário do rio Pacoti.....	42
Figura 8 - Sistema de cultivo coberto na UPPMAR. No detalhe (A) o tanque de estocagem dos reprodutores utilizados neste estudo.....	43
Figura 9 - (A) Captura dos animais com o auxílio de puçás; (B) Imersão em solução anestésica (Egenol 4%); (C) e (D) Biometria dos animais, medição e pesagem respectivamente.....	45
Figura 10- Aplicação de pressão abdominal para a verificação da presença de sêmen como indicador de maturação gonadal nos machos.....	45
Figura 11 - Aplicação de Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG – Chorulon Intervet) em ariacó (<i>L. synagris</i>) para indução à espermiacão.....	46
Figura 12- Coleta de sêmen de ariacó (<i>L. synagris</i>).....	47
Figura 13- Esquema de contagem de células espermáticas na câmara de Nubauer. Foram considerados para contagem os quadrantes marcados em vermelho.....	48
Figura 14- Pistilo utilizado na maceração do sêmen de ariacó.....	50
Figura 15- Amostras de sêmen de ariacó coradas com reagente de Bradford (1976) para dosagens das proteínas totais.....	51

Figura 16	Cuba vertical de eletroforese Ruby (GE Healthcare Lifesciences, USA) no Laboratório de Fisiologia Animal, UFC.....	52
Figura 17-	Excisão das bandas de proteínas do sêmen de ariacó dos géis de poliacrilamida.....	54
Figura 18-	Morfologia dos espermatozoides de ariacó. Fotografias de microscopia óptica (x 60) de danos primários (b-f) e secundários (f-g). (a) Espermatozoide normal. (b) Macrocefalia; (c) microcefalia; (d) cabeça degenerada; (e) cauda degenerada; (f) cabeça livre e (g) cauda com simples dobra.....	62
Figura 19-	Defeitos morfológicos encontrados em espermatozoides de ariacó, nos grupos controle e tratados com hCG. Colunas em cinza escuro representam o grupo controle e em cinza claro o grupo induzido. As barras indicam a média \pm S.E.M. MAC, macrocefalia; MIC, microcefalia; HD, cabeça degenerada; DT, cauda defeituosa; DH, cabeça livre; SBT, cauda com simples dobra.....	63
Figura 20-	Sêmen de ariacó separado por SDS-PAGE unidimensional (12,5% acrilamida). Pontos pretos indicam os tipos de bandas individualmente submetidas à ESI-QUAD-TOF. MW- peso molecular (220-14 KDa). As proteínas foram coradas com azul de Coomassie R-250. Cada <i>lane</i> representa uma amostra de um único animal.....	66
Figura 21-	Intensidades (média \pm erro padrão) das proteínas do sêmen de ariacó diferencialmente expressas nos grupos controle e tratado com hCG. Barras com superescritos diferentes são diferentes pelos testes t de Student ou Tukey ($p < 0,05$).....	72
Figura 22-	Análises <i>In silico</i> da interação proteína-proteína do sêmen de ariacó tratados com hCG. (a) e (b) mais abundantes, (c), (d), (e) e (f) diferencialmente expressas. (a) creatina quinase; (B) tubulina (c) PSP-I; (d) HSP90AA1; (e) ubiquitina carboxi-terminal hidrolase 5 e (f) transferrina. As proteínas foram analisadas com STRING software. A busca foi realizada com confiança média. As cores diferentes das linhas representam os tipos de	75

associações: (-) co-expressão; (-) experimentos; (-) co-ocorrência; (-) mineração textual; (-) banco de dados e (-) homologia.....

Figura 23-	Gráficos de pizza mostrando a ontologia gênica das proteínas do sêmen de ariacó baseado nos processos biológicos, função molecular e componente celular relativo à elas. Os dados de proteínas foram analisados usando o software <i>STRAP</i> (BHATIA et al., 2009). Os termos da Ontologia gênica foram obtidos dos bancos de dados <i>UniProtKB</i> e <i>EBI GOA</i>	78
Quadro 1-	Descrição das patologias analisadas em espermatozoides de ariacó (<i>L. synagris</i>) (adaptada de Miliorini et al., 2011).....	52

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	15
2	CAPÍTULO 1: O ESTADO DA ARTE NO CULTIVO DE LUTJANÍDEOS	17
2.1	Descrição da família <i>Lutjanidae</i>	17
2.2	<i>Lutjanus synagris</i> (ariacó)	18
2.3	Estoques naturais	21
2.4	Mercado global de pescado	22
2.5	Cultivo de peixes Lutjanídeos	24
2.5.1	<i>Reprodução em cativeiro</i>	25
2.5.1.1	<i>Fisiologia da Reprodução</i>	25
2.5.1.2	<i>Indução Hormonal</i>	27
2.5.2	<i>Análise de sêmen</i>	29
2.5.2.1	<i>Parâmetros Espermáticos</i>	29
2.5.2.2	<i>Metabolismo espermático</i>	29
2.5.2.3	<i>Morfologia espermática</i>	31
2.5.2.4	<i>Concentração espermática</i>	33
2.5.2.5	<i>Proteínas seminais</i>	33
2.6	Larvicultura de peixes Lutjanídeos	34
2.7	Desova de peixes Lutjanídeos	35
2.7.1	<i>Terapias Hormonais</i>	36
2.8	Conservação de sêmen	37
3	CAPÍTULO 2: PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SEMEN DE ARIACÓ (<i>Lutjanus synagris</i>, Perciformes) TRATADOS COM GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)	39
3.1	Introdução	39
3.1.1	<i>Objetivos</i>	41
3.1.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	41
3.2	Materiais e métodos	42
3.2.1	<i>Locais de realização do estudo</i>	42
3.2.2	<i>Captura das matrizes e manejo geral</i>	43
3.2.3	<i>Obtenção de sêmen</i>	44

3.2.3.1	<i>Indução Hormonal</i>	44
3.2.3.2	<i>Coleta de sêmen</i>	46
3.2.4	<i>Análise de sêmen</i>	47
3.2.4.1	<i>Concentração espermática</i>	47
3.2.4.2	<i>Volume de sêmen ejaculado</i>	48
3.2.4.3	<i>Morfologia</i>	48
3.2.4.4	<i>Teste de dispersão da cromatina (SCD)</i>	49
3.2.4.5	<i>Extração de proteínas das amostras de sêmen</i>	49
3.2.4.6	<i>Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) das proteínas do sêmen</i>	51
3.2.4.7	<i>Análise das imagens dos géis 1 D</i>	53
3.2.4.8	<i>Digestão das proteínas</i>	53
3.2.4.9	<i>Identificação das proteínas usando espectrometria de massa (ESI-Q-ToF) e pesquisa de dados</i>	54
3.2.4.10	<i>Ontologia gênica</i>	55
3.2.4.11	<i>Análise de interação das proteínas</i>	55
3.2.5	<i>Análise estatística</i>	56
3.3	Resultados e Discussão	57
3.3.1	<i>Obtenção de sêmen</i>	57
3.3.1.1	<i>Indução Hormonal</i>	57
3.3.1.2	<i>Coleta de sêmen</i>	57
3.3.2	<i>Análise de sêmen</i>	58
3.3.2.1	<i>Concentração espermática, volume de sêmen e teste de dispersão de cromatina</i>	58
3.3.2.2	<i>Morfologia</i>	61
3.3.2.3	<i>Proteínas do sêmen</i>	65
3.3.2.4	<i>Ontologia gênica</i>	77
3.4	Conclusões	79
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
5	REFERÊNCIAS	81
6	APÊNDICE 1	121

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SEMEN DE ARIACÓ (*Lutjanus synagris*, Perciformes) TRATADOS COM GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

MAYRA BEZERRA VETTORAZZI

1- APRESENTAÇÃO

A presente Tese de Doutorado apresenta um estudo sobre as condições fisiológicas do sêmen e espermatozoides de ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758) quando submetido à terapia hormonal de indução à desova com hCG (gonadotrofina coriônica humana).

Este estudo foi motivado pela escassez de informações sobre aspectos da biologia reprodutiva de ariacó e pelo interesse do Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR da Universidade Federal do Ceará-UFC, em desenvolver pacotes tecnológicos que alavanquem o mercado de piscicultura marinha brasileira.

A Tese está dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo relata o estado da arte do cultivo de lutjanídeos em todas as regiões do globo. Nele são abordadas as condições físicas dos estabelecimentos, sistema de cultivo, aspectos nutricionais e principais problemáticas estudadas nas diferentes espécies desta família. Este capítulo também descreve as técnicas utilizadas para viabilizar a reprodução em cativeiro, com ênfase em biotécnicas.

O segundo capítulo apresenta descrições e resultados obtidos nos experimentos de indução à desova com injeção de hCG. Foram comparadas características morfológicas e de motilidade dos espermatozoides, bem como de integridade de DNA entre indivíduos que receberam a dose hormonal e indivíduos controle. Também neste capítulo, a expressão proteica dos espermatozoides de ariacó está descrita em detalhe, sendo apresentado o mapa de presença e intensidade das proteínas. Além disso, a classificação das proteínas do sêmen quanto à função molecular é descrita, processos celulares nos quais estão envolvidas e à quais componentes celulares pertencem. É discutido ainda quais grupos proteicos estão presentes em função da terapia hormonal e a viabilidade da utilização de hCG para a indução da desova de ariacó em cativeiro.

Finalmente, consta uma abordagem geral dos assuntos apresentados na tese, uma análise das perspectivas das técnicas de reprodução assistida de ariacó no Estado do Ceará,

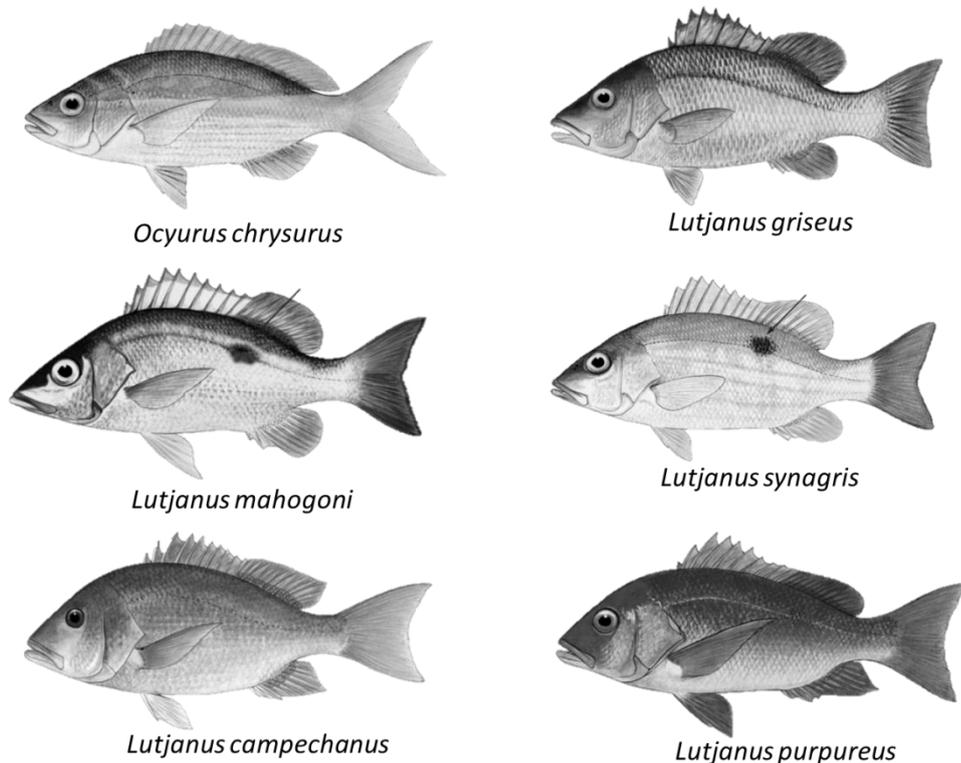
considerações e recomendações para a difusão do cultivo desta espécie e sugestões para a continuidade e o aprofundamento de temas correlatos.

2- CAPÍTULO 1 – O ESTADO DA ARTE NO CULTIVO DE LUTJANÍDEOS

2.1 Descrição da família *Lutjanidae*

Os peixes vermelhos (*snappers*, em inglês) estão incluídos na família *Lutjanidae* (ordem *Perciformes*; subclasse *Actinopterygii*; infra filo *Vertebrata*), de acordo com a classificação taxonômica (NELSON, 2006). São peixes em sua maioria marinhos, porém ocorrem também em ambiente estuarino e dulcícola, em áreas tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. A família *Lutjanidae* é formada por dezessete gêneros e cento e dez espécies de peixes vermelhos. Animais desta família têm as seguintes características morfológicas: boca terminal moderada à grande; dentes caninos bastante frequentes nas mandíbulas, e pequenos dentes no palato; maxilar que desliza abaixo da cavidade pré-orbital quando fechada; supra maxila ausente; sete rastos branquiais; nadadeira dorsal contínua ou com um entalhe raso, com 9 a 12 espinhos e 9 a 18 raios; nadadeira anal com três espinhos e 7 a 11 raios; nadadeiras pélvicas com inserção logo ao final da base peitoral; nadadeira caudal truncada à marcadamente furcada; 24 vertebras (10+14); comprimento máximo médio de um metro (NELSON, 2006) (Figura 1).

Figura 1 – Ilustração representativa de exemplares da família Lutjanidae. Adaptado de FAO (2002).



2.2 *Lutjanus synagris* (ariacó)

O ariacó, *L. synagris*, (Figura 2), foi descrito por Carolus Linnaeus, no ano de 1758. Apresenta corpo moderadamente alto, focinho pontudo, caninos moderadamente desenvolvidos em ambas as mandíbulas. Nadadeira dorsal com 10 espinhos e 12 (raramente 13) raios, nadadeira anal arredondada com três espinhos e oito ou nove raios, sendo as nadadeiras peitorais relativamente curtas, não atingindo o nível do ânus, apresentando 15 ou 16 raios. Acima da linha lateral apresenta listras amarelas oblíquas e o abdômen é coberto de listras amarelas horizontais, geralmente de oito a 10. Tem dorso rosado ou avermelhado e a porção inferior das laterais e ventre prateada amarelada, com nadadeiras amareladas a avermelhadas. Próximo ao pedúnculo caudal, acima da linha lateral e abaixo dos raios da nadadeira dorsal, vê-se uma mancha preta difusa, maior que o olho, eventualmente não mais que 1/3 desta mancha pode se localizar abaixo da linha lateral (ALLEN, 1985).

Figura 2 – *Lutjanus synagris*, o ariacó. Exemplar utilizado no presente estudo.



Na língua inglesa, *L. synagris* recebeu denominação de *lane snapper*, em francês *vivaneau gazou* e em espanhol *pargo biajaiba*. No nordeste brasileiro é conhecido como ariacó. O ariacó possui hábitos demersais e vive em águas quentes, estando frequentemente associados a fundos coralinos e rochosos, entre a zona costeira e a profundidade de 400 m. Ocorre desde a Carolina do Norte, Estados Unidos, até o sudeste brasileiro, incluindo todo o mar do Caribe e o Golfo do México (Figura 3). Destaca-se por sua carne saborosa e pele avermelhada, que o valoriza economicamente (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980; ALLEN, 1985).

O ariacó é encontrado associado a diversos tipos de substratos, porém destaca-se próximos a regiões recifais. Alimenta-se durante a noite de pequenos peixes, camarões, gastrópodes e cefalópodes (ALLEN, 1985). No Golfo do México o ariacó aparece como uma espécie comercialmente importante, e já foram estudadas sua biologia pesqueira (TORRES et al., 1990), ecologia e dinâmica populacional (RIVERA-ARRIAGA et al., 1996). Em Cuba, sua ecologia, ciclo de vida, reprodução e biologia pesqueira são conhecidos (CLARO 1981a/b e 1982).

Figura 3 – Área de ocorrência do ariacó (*L. synagris*) no Atlântico indicada em vermelho.



Fonte: Aquamaps (Computer generated distribution maps for *Lutjanus synagris* (Lane snapper), with modelled year 2100 native range map based on IPCC A2 emissions scenario. www.aquamaps.org, version of Aug. 2016. Web. Accessed 11 Dec. 2018).

Com grande aceitação de mercado nacional e internacional, características sensoriais bastante apreciadas e relativa rusticidade, o ariacó pode ser considerado como uma espécie com grande potencial para a aquicultura marinha. Nos Estados Unidos, em 2010, o desembarque doméstico de vermelhos alcançou a marca de 190.538 toneladas e movimentou 12,903 bilhões de dólares, sendo 188,810 toneladas desembarcadas em Porto Rico. O ariacó participou desta cota com 30.592Kg, movimentando 157,745 mil dólares (NATIONAL MARINE FISHERIES SERVICE OFFICE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2010). De acordo com dados da FAO, o preço de peixes lutjanídeos (*Lutjanus* spp.) nas importações americanas aumentou, entre 2005 e 2008, em média 9,37% (peixes congelados) e 6,5% (peixes frescos) ao ano (FAO, 2012).

No Brasil, o desembarque de ariacó somou, em 2009, 2.046 toneladas de um total de 510.523 toneladas de pescado (MPA, 2010). No Ceará, onde se destaca com a quinta posição dentre as espécies de peixes mais capturadas, alcançou uma produção estimada de 804,5 toneladas no ano de 2006, movimentando cerca de R\$ 4,102 milhões de reais (IBAMA, 2008). A produção da pesca do ariacó (*Lutjanus synagris*) do Estado do Ceará foi 2,4 vezes maior que a do pargo (*L. purpureus*) e cerca de 6 vezes superior a da cioba (*L. analis*) no ano de 2007, último ano de coleta de dados do EstatPesca (IBAMA, 2008).

No Brasil, as primeiras investigações sobre o ariacó foram realizadas no estado do Ceará na década de 70, sendo abordados aspectos de idade e crescimento (ALEGRIA e MENEZES, 1970) e fecundidade (GESTEIRA e ROCHA, 1976). Recentemente foi determinado por Sousa-Júnior et al. (2008) que, na cosata do Ceará, esta espécie se reproduz ao longo de todo o ano com picos entre janeiro e abril. Os mesmos autores determinaram o comprimento médio de primeira maturação de 23,4 cm (comprimento total).

Lima (2004) realizou estudos em idade e crescimento em estoques de *L. synagris* capturados na costa norte da Bahia, justificando a importância comercial da espécie que, segundo Klippel e Pérez (2002), está entre as dez principais espécies capturadas na pesca de linha da costa central do Brasil.

2.3 Estoques naturais

Os principais estoques globais de recursos pesqueiros estão em declínio em decorrência da sobrepesca e da degradação dos habitats (MYERS E WORM, 2003; LORENZEN et al., 2010). Os impactos da perda da biodiversidade em ecossistemas oceânicos foram estudados por Worm et al. (2006), que reportaram uma séria preocupação com um colapso global de todas as grandes pescarias comerciais no meio do século 21, por volta do ano de 2048. Mais recentemente, Worm et al. (2016) e Kroodsma et al. (2018) também relataram declínios em grandes estoques de recursos pesqueiros.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2018), a produção mundial de pescado atingiu em 2016, a marca de 170,9 milhões de toneladas, sendo que a pesca extrativista contribuiu com 90,9 milhões de toneladas. Deste total, a pesca em águas marinhas e em águas interiores forneceu 87,2 e 12,8% do total global, respectivamente. As capturas marinhas totais mundiais foram de 79,3 milhões de toneladas em 2016, representando uma diminuição de quase 2 milhões de toneladas dos 81,2 milhões de toneladas de 2015. A pesca mundial em águas interiores produziu 11,6 milhões de toneladas em 2016, um aumento de 2,0% em relação ao ano anterior e de 10,5% em comparação com a média dos últimos dez anos (FAO, 2018).

Em todo o globo são percebidas mudanças na biomassa capturada de importantes espécies marinhas, e juntamente com a percepção da ação das mudanças climáticas nas populações de peixes, uma consciência generalizada, de que uma simples abordagem para o manejo das pescarias não é suficiente, vem se instalando aos poucos. Steele e Schumacher (2000) investigando teorias ecológicas de como teriam sido as populações selvagens antes da

instalação das pescarias industriais, sugeriram que, caso a comunidade científica estivesse interessada nas consequências destas pescarias em estoques recém-descobertos, ou mesmo na recuperação daqueles em depleção, seria imperativo considerar os efeitos não só sobre as populações sob estresse, mas em todos os componentes do sistema.

Stein et al. (2018) apresentaram recentemente um estudo que apontou as prioridades globais para conservações de vários estoques pesqueiros globais. Para Simpfendorfer e Dulvy (2017), a solução para diminuir a pesca é simplesmente parar de retirar os recursos pesqueiros dos oceanos, ou então proibir o transporte, a venda ou o comércio destes.

Os estoques de peixes vermelhos da família *Lutjanidae* também tem apresentado declínio em decorrência da exploração pesqueira (SALLES et al., 2006). O esforço realizado pela pesca industrial e artesanal sobre os principais estoques pesqueiros exploradas no Nordeste Brasileiro tem levado as populações dos principais recursos pesqueiros da região, incluindo os peixes vermelhos da família *Lutjanidae*, a estarem em sobrepesca ou em vias de colapso (FONTELES-FILHO, 2011).

2.4 Mercado global de pescado

De acordo com as informações estatísticas mais recentes da produção mundial para o ano de 2016, constantes no documento intitulado “Estado Mundial da Aquicultura”, publicação da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2018), entre os anos de 1961 e 2016, o aumento no consumo médio mundial anual de peixe (3,2%) foi maior que o crescimento populacional (1,6 %) no mesmo período, e excedeu o consumo de todas as carnes de origem de animais terrestres juntas (2,8%).

Neste contexto, os dados da FAO constantes no documento citado (FAO, 2018), mostraram que a produção mundial de pescado atingiu, em 2016, a marca de 170,9 milhões de toneladas. A pesca extrativista contribuiu com 90,9 milhões de toneladas, sendo que 19,7 milhões de toneladas não foram utilizados para fins alimentícios. Apesar do ligeiro aumento, comparado aos dois anos anteriores, à atividade pesqueira extrativista segue praticamente estável desde o final da década de 1980, devido à sobre exploração. Desta forma, da produção total de 90,9 milhões de toneladas da pesca, apenas 71,2 milhões de toneladas foram destinadas ao consumo humano. Do total de pescado capturado pela pesca globalmente em 2016, a pesca marinha contribui com 87,24%. A porção de recursos marinhos pescados dentro dos níveis biologicamente sustentáveis passou de 90% em 1974 para 66,6% em 2015. Estes dados, juntamente com outros concernentes aos níveis de sobrepesca levaram as Nações

Unidas a incluírem mais um alvo nos objetivos de desenvolvimento sustentável: acabar com a sobrepesca até 2020.

A produção aquícola mundial no ano de 2016 foi de 80,0 milhões de toneladas (FAO, 2018), sendo que a aquicultura marinha contribuiu apenas com 35,88%. Por outro lado, a aquicultura marinha tem crescido paulatinamente ao longo dos anos, tendo a produção em 2016 chegado a 28,7 milhões de toneladas (FAO, 2018). Os principais produtores são Ásia (56,9%), seguida de Europa (27,8%), América (13,8%), Oceania (1,2%) e África (0,2%).

Desde o estabelecimento da União Europeia, este tem sido o maior mercado importador de pescado e derivados, seguidos dos Estados Unidos e do Japão. Nos anos de 2016 e 2017, as importações de pescado e derivados cresceram nestes três mercados como resultado do crescimento econômico e da valorização do dólar americano. Países em desenvolvimento, especialmente Brasil, Índia e Indonésia, ganharam importância no mercado das exportações devido ao aumento da sua produção e ao melhoramento dos sistemas de distribuição (FAO, 2018).

O Brasil aparece como o oitavo maior produtor de pescado por aquicultura continental, com 507,1 mil toneladas no último levantamento da FAO (2018). O grande mercado dos Estados Unidos, juntamente com o mercado interno do Brasil, pode oferecer uma boa oportunidade de escoamento da produção brasileira se estiver em consonância com as espécies produzidas no nosso país. Os desembarques norte-americanos (4832 ton³) não suprem a demanda de pescado daquele país, e a importação de peixes vermelhos (*Lutjanídeos*) aumentou de 1,1 ton³ (equivalente a \$4 289) em 1989 para 11374 ton³ (equivalente a \$38,7 milhões) em 1998 (Watanabe et al. 2001; NMFS 2002). Outro grande mercado aberto à este recurso seria o México. Neste país, as capturas de *Lutjanídeos* em 2013 chegaram a 5851 ton³, o equivalente a \$194,396 milhões de pesos mexicanos (CONAPESCA 2013).

O interesse no cultivo de peixes vermelhos da família *Lutjanidae* (snappers) tem crescido em todo o mundo principalmente pelo declínio dos estoques naturais e pela alta demanda e valor de mercado. Iniciativas ligadas às universidades federais brasileiras surgiram ao longo dos últimos dez anos para suprir lacunas ainda não respondidas sobre os requerimentos fisiológicos reprodutivos de *Lutjanus synagris* (VETTORAZZI, et al., 2010; SANCHES E CERQUEIRA, 2010; SANCHES, et al., 2015; SOUZA et al., 2016).

2.5 Cultivo de peixes Lutjanídeos

Nos últimos vinte anos vários grupos de pesquisa dedicaram esforços de diferentes magnitudes para o desenvolvimento de procedimentos padrões de cultivo de Lutjanídeos. Abordagens diferentes para desempenho zootécnico segundo os meios de cultivo, nutrição, reprodução e larvicultura são os principais aspectos citados na literatura (EMATA et al., 2003; EMATA e BORLONGAN, 2003; LE e HOA, 2017; CASTILLO-VARGASMACHUCA et al., 2018;).

Os sistemas de cultivo mais utilizados são gaiolas flutuantes e tanques circulares (VETTORAZZI et al., 2010; CASTILLO-VARGASMACHUCA et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2015; SOUZA et al., 2015; 2016; CASTILLO-VARGASMACHUCA et al., 2018;). Entretanto, Vettorazzi (2012) sugeriu que alguns parâmetros seminais importantes para a fertilização podem ser beneficiados quando os indivíduos se encontram em gaiolas flutuantes (condição mais próxima do ambiente natural), em detrimento de tanques *indoors*. Outras vantagens do cultivo em gaiolas flutuantes são mais elementares, como a renovação de água e aeração sem o custo de energia elétrica (CASTILLO-VARGASMACHUCA et al., 2018), porém para escolher esta modalidade deve-se obrigatoriamente instalar o cultivo em áreas abrigadas de ventos, ondas, correntes e tempestades, bem como predadores. Já em cultivos em tanques com recirculação de água o grau de controle das condições físico-químicas pode maximizar a produção, elevar os lucros e livrá-la de agentes naturais indesejados (HERNÁNDEZ et al., 2015).

Diversas espécies de lutjanídeos têm sido cultivadas com sucesso, tais como *L. argentimaculatus* na Ásia (EMATA et al., 1994; CHOU et al., 1995; LIAO et al., 1995), *L. johni* (LIM et al., 1985), *L. synagris* (SANCHES et al., 2015; SOUZA et al., 2015; 2016), *L. griseus* (RICHARDS e SAKSENA, 1980); *L. analis* (WATANABE et al., 1998; 2001), e *L. chysurus* (TURANO et al., 2000).

A dependência de alevinos é um dos gargalos para a produção aquícola, e o completo domínio sobre a larvicultura é decisivo na implantação de cultivos comerciais. Não raramente pesquisas no cultivo de lutjanídeos têm reportado baixas taxas de sobrevivência larval, comumente observadas no momento da primeira alimentação ou imediatamente após, ou entre a transição entre diferentes tipos de presas.

2.5.1 Reprodução em cativeiro

Para o desenvolvimento da aquicultura industrial sustentável precisa controlar o processo reprodutivo em cativeiro (MYLONAS et al., 2010). Porém muitas espécies de peixes de alto valor comercial que poderiam estar sendo cultivadas ainda dependem da disponibilidade de juvenis selvagens (OTTOLENGHI et al., 2004).

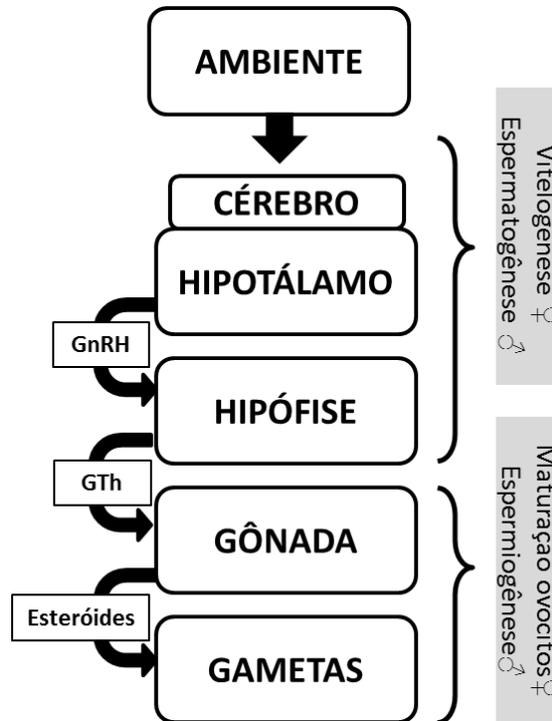
A reprodução de peixes em cativeiro necessita que haja uma sincronização das matrizes reprodutoras e destas com o meio no qual estão inseridos. Esta sincronização permite que ocorra uma cascata de eventos hormonais internos que irão desencadear a maturação dos tecidos reprodutores. Várias espécies conseguem atingir a maturidade em cativeiro normalmente (HONG e ZHANG, 2002), porém a desova em condições laboratoriais pode ser muito difícil para outras tantas. Dentre estas dificuldades, se destacam falhas na maturação final dos ovócitos em fêmeas (ZOHAR, 1989; PETER et al., 1993), e pequena produção e/ou baixa qualidade de sêmen em machos (BILLARD, 1986, 1989).

Tais problemas podem, em alguns casos, serem mitigados com a manipulação de fatores abióticos como temperatura, fotoperíodo, salinidade, volume de água (profundidade), substrato, etc. (ZOHAR, 1989; MUNRO et al., 1990; YARON, 1995). Porém, em algumas espécies de peixes, para vencer a ausência dos estímulos naturais à reprodução, somente a manipulação hormonal exógena pode ser confiável no controle da reprodução. A indução hormonal também pode ser vantajosa em peixes de desova parcelada, por haver dificuldade na coleta simultânea de material gamético de machos e fêmeas (KIME et al., 2001).

2.5.1.1 Fisiologia da reprodução

A reprodução é uma função orgânica regulada por fatores ambientais externos que funcionam como gatilhos para o desencadeamento de liberações hormonais internas (ROTTMANN et al., 1991). O ciclo reprodutivo de peixes teleósteos é similar ao de outros vertebrados e ocorre em duas fases (Figura 4). A primeira fase consiste da proliferação, crescimento e diferenciação dos gametas (chamada de vitelogênese e espermatogênese, em fêmeas e machos, respectivamente), enquanto que a segunda fase abrange a liberação dos ovócitos e espermatozoides (maturação dos ovócitos e espermiogênese, em fêmeas e machos, respectivamente).

Figura 4 – Esquema ilustrativo da sequencia de estímulos hormonais que precede a formação dos gametas em teleósteos (GnRH: Hormônio liberador de Gonadotrofina; GTh: Gonadotrofinas).



Em vertebrados, o processo interno regulatório do processo reprodutivo responde ao eixo cérebro-hipotálamo-hipófise-gônada. O estímulo ambiental (maior luminosidade, temperatura, nutrientes dissolvidos, etc.) é recebido pelo cérebro e encaminhado para sua porção chamada hipotálamo. O hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que estimula a glândula hipófise. Uma vez estando a hipófise estimulada, esta produz e libera hormônios gonadotrópicos (GtH), ou gonadotrofinas (hormônio luteinizante, LH e hormônio folículo estimulante, FSH), que caem na corrente sanguínea e se dirigem às gônadas (ovários e testículos). Os hormônios gonadotrópicos induzem a produção e liberação de esteróides que, por sua vez, induzem à maturação final e liberação de ovócitos e sêmen. Em machos, a primeira fase (espermatogênese) inclui a proliferação das espermatogônias, células primitivas que darão origem a células diferenciadas, as espermatídes. O processo é completado com a produção do espermatozoide flagelado, isto é, a espermiogênese (BILLARD, 1986; SCHULZ e MIURA, 2002), um importante passo para a diferenciação das espermatídes haploides em espermatozoides flagelados e durante o qual a morfologia do espermatozoide espécie-específico é determinada (BILLARD et al., 1986; PUDNEY, 1995; SCHULZ e MIURA, 2002).

Em peixes, a espermiacão corresponde à liberação dos espermatozoides nos dutos espermáticos. Ao mesmo tempo a produção de fluido seminal também é observada (LAFLEUR e THOMAS, 1991). Pelo menos em algumas espécies, este processo pode ser associado com a aquisição da capacidade de fertilização do espermatozoide (SCHULZ e MIURA, 2002). O espermatozoide é liberado em dutos espermáticos durante a segunda fase do ciclo reprodutivo masculino, ou seja, a espermiacão, que ocorre durante a estação reprodutiva. O sêmen é ejaculado espontaneamente pelo peixe ou pode ser, em caso de animais em cativeiro, extraído com aplicação de pressão abdominal (extrusão). A espermiacão e ejaculação parecem ser sincronizadas com a desova das fêmeas via comunicação feromonal (STACEY, 2003).

A espermatogênese e a espermiacão podem ser temporariamente separadas e durante a estação reprodutiva os testículos podem conter exclusivamente espermatozoides (BILLARD, 1986; MALISON et al., 1994). Na maioria das espécies de peixes, entretanto, existe uma sobreposição significativa entre os dois processos, com ambos espermatogênese e espermiacão ocorrendo durante a estação reprodutiva (JACKSON e SULLIVAN, 1995; MYLONAS et al., 2003; RAINIS et al., 2003).

Em peixes, normalmente, os machos apresentam um período mais longo de espermiacão, o qual engloba a estação de desova das fêmeas, e podem fertilizar ovócitos de várias fêmeas na natureza. Adicionalmente, uma fêmea pode desovar com mais de um macho, seja em apenas uma ocasião ou em diferentes e sucessivas ocasiões (PETERSSON e JÄRVI, 2001). Esse comportamento masculino e feminino garante o sucesso reprodutivo do indivíduo e favorece a manutenção da variabilidade genética dentro de uma população selvagem, o que não ocorre necessariamente em populações confinadas.

O estímulo da espermiacão no início do período reprodutivo parece ser bastante útil, quando machos e fêmeas pertencem a diferentes plantéis e estão submetidos a diferentes regimes de manejo (BILLARD, 1986). Por esta razão o uso de recursos tecnológicos de preservação de sêmen também é bastante indicado para o armazenamento e também para o transporte (KIME et al., 2001).

2.5.1.2 Indução Hormonal

Em se tratando de peixes machos, a maioria dos métodos de indução à reprodução empregados em aquicultura não são destinados à indução da espermatogênese, que é um

longo processo durando muitos dias ou semanas, mas sim à indução da espermiogênese e à produção do fluido seminal que por sua vez permite um maior número de espermatozoides serem expelidos dos testículos (MYLONAS et al., 1997, 1998). Neste caso, é aplicada a técnica que atuará diretamente na gônada, as gonadotrofinas.

A principal vantagem do uso de hormônios gonadotróficos, como a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), é que eles agem diretamente sobre as gônadas não sendo necessária a ativação da hipófise. A desvantagem é que estes hormônios podem desencadear uma resposta imune nos peixes após longos períodos de tratamento sendo, em alguns casos, imuno neutralizados. O resultado é que são necessárias doses cada vez maiores, ou então o tratamento deixa ser efetivo (ZOHAR e MYLONAS, 2001).

Os métodos utilizados para induzir à espermiacção são requeridos em algumas situações nas quais este processo é bloqueado completamente. Por exemplo, em casos de domesticação fraca ou quando as condições de cultivo não estão de acordo com a ecobiologia da espécie. O controle da espermiacção pode também ser necessário para sincronizar a produção de sêmen com a ovulação das fêmeas, para um bom manejo das matrizes. Finalmente, o sêmen necessita ser avaliado no exato momento e com a quantidade e qualidade requeridas quando planos de reprodução estão sendo executados para propósitos de seleção genética, ou para criopreservação, para preservar recursos genéticos de interesse (HOLT, 2000).

Várias espécies de lutjanídeos já foram alvos de experimentos com indução hormonal: *L. griseus*, *L. erythropterus*, *L. russelli*, *L. argentimaculatus*, *L. peru*, *L. guttatus*, *L. campechanus* e *L. synagris* (CABRERA et al., 1998; HONG e ZHANG, 2002, EMATA, 2002 e 2003; DUMAS et al., 2004; IBARRA-CASTRO e DUNCAN, 2007; BOZA-ABARCA et al., 2008; IBARRA-CASTRO e LAJONCHERE, 2009; PHELPS et al., 2009; PASSOS-NETO, 2010).

2.5.2 *Análise de sêmen*

2.5.2.1 *Parâmetros espermáticos*

Os espermatozoides são células de natureza única nos organismos. Em espécies de fertilização externa, eles são liberados em meio hostil aonde têm que lidar com condições extremamente agressivas, seja em água doce, salgada ou salobra, a procura de ovócitos ainda não fecundados (COSSON, 2004).

Os espermatozoides de peixes variam em estrutura (JAMIESON, 1991), refletindo sua história evolutiva de mais de 550 milhões de anos, variação genética e adaptação espacial ao ambiente (SUQUET et al., 2000).

Em relação à aquicultura, o conhecimento da biologia da espécie é importante basicamente por dois aspectos. Primeiramente, para concluir o processo de fertilização sob condições de cativeiro (levando-se em consideração que os parâmetros espermáticos variam bastante entre os espécimes e dentro do período reprodutivo). Em segundo lugar, para o desenvolvimento de técnicas de estocagem de sêmen a curto e longo prazos, incluindo criopreservação (GROISON et al., 2010, b).

2.5.2.2 *Metabolismo espermático*

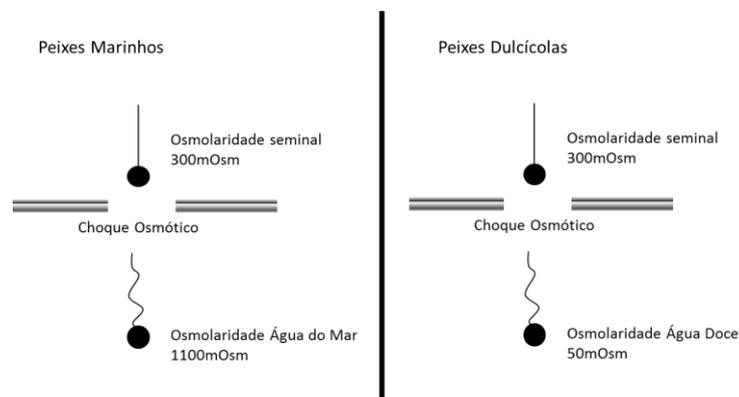
Os espermatozoides são imóveis no plasma seminal dentro do testículo, Na maioria das espécies de peixes (TAKAI e MORISAWA, 1995; STOSS, 1983; BILLARD, 1986), em contraste do que ocorre em répteis e mamíferos (KRASZNAI et al., 2003). Assim, a motilidade somente é adquirida logo após a liberação do sêmen no meio aquoso. Existem relações entre a composição do fluido seminal e as do meio aquoso em que a reprodução se dá. A motilidade é afetada por muitos fatores, sendo os principais a concentração de componentes osmoticamente ativos (osmolaridade), pH e temperatura.

A mudança na osmolaridade e concentração iônica do ambiente externo são os gatilhos para o início da motilidade espermática em peixes (TAKAI e MORISAWA, 1995). O plasma seminal de peixes marinhos apresenta concentração de íons K^+ e Na^+ similar às do plasma sanguíneo (MORISAWA, 1985; COSSON, 2010). Além disto, a concentração de células no trato genital normalmente é muito alta, o que contribui para a imotilidade pela

exaustão de O_2 e a grande liberação de CO_2 no plasma seminal, como no caso de peixes achatados (INABA et al., 2003). As células epiteliais do ducto espermático parecem ter papel importante na secreção dos íons responsáveis pela osmolaridade.

Os espermatozoides permanecem imóveis no plasma seminal, isosmótico ao sangue, até que sejam diluídos (expelidos) em solução hiperosmótica (água do mar), enquanto que nos peixes de água doce ocorre o oposto, ou seja, a imotilidade é superada pela hiposmolaridade da água doce (Figura 5).

Figura 5 – Esquema ilustrativo das condições gerais de osmolaridade requeridas para a ativação da motilidade espermática em peixes marinhos ou dulcícolas.



O início da motilidade é seguido imediatamente de uma resposta natatória veloz, e alto consumo de energia pelo espermatozoide, levando, conseqüentemente, a um período móvel bastante breve (COSSON et al., 1999).

A análise de motilidade contabiliza a percentagem de espermatozoides móveis presentes numa amostra de sêmen. A progressividade desta motilidade consiste na capacidade que o espermatozoide tem em “percorrer um caminho”, enquanto que a motilidade apenas diz respeito à aptidão do espermatozoide para se movimentar, ainda que seja no mesmo sítio (motilidade *in situ*). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2010) a motilidade espermática pode ser classificada de três maneiras: (I) Motilidade Progressiva, que inclui espermatozoides em movimentos ativos, seja em linha reta ou em círculos; (II) Motilidade Não-Progressiva, inclui espermatozoides com movimentos de vibração flagelar sem necessariamente se deslocar; (III) Imotilidade, ausência completa de atividade motora. Para que o espermatozoide consiga alcançar o ovócito, é mais importante uma boa progressividade do que uma boa motilidade.

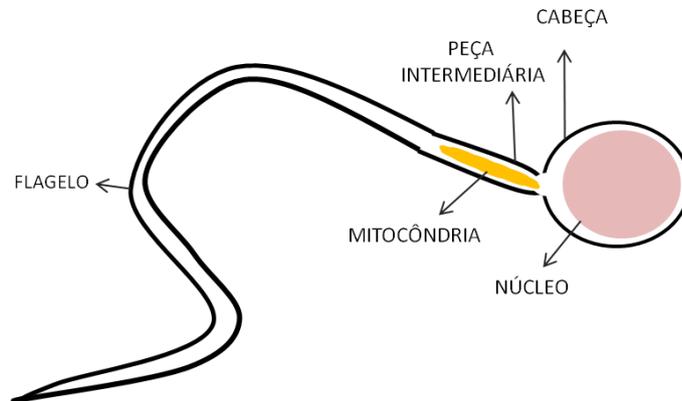
A energia para a motilidade e o metabolismo básico dos espermatozoides é derivada da quebra de nutrientes exógenos e endógenos, na presença ou ausência de oxigênio (STOSS, 1983), processo que ocorre nas mitocôndrias, localizadas na peça intermediária (ALAVI et al., 2009).

Durante o período no qual a célula espermática está móvel, pode ser observado um decréscimo dos parâmetros que descrevem a motilidade. O batimento flagelar apresenta padrões característicos em cada período da fase móvel. Na primeira fase da motilidade, a cauda apresenta padrão ondulatório pleno, ou seja, em toda a sua extensão; em um segundo momento, a cauda assume um padrão intermediário, com movimento ondulatório observado somente em sua parte proximal; no final do período móvel ocorre a restrição do movimento ondulatório à terceira ou quarta parte do comprimento da cauda, levando a uma restrição do batimento ondulatório até o completo repouso da cauda. Toda a evolução do movimento flagelar é marcada pelo batimento flagelar, que inicialmente é máximo e pode chegar a 100 Hz, mas normalmente permanece entre 50 e 70 Hz, variando com a espécie (COSSON et al., 1997). Este parâmetro é essencial ao analisarmos a qualidade espermática, pois se trata justamente do aparato mecânico que impulsionará o espermatozoide em direção ao óvulo e dele depende o sucesso da potencial fecundação.

2.5.2.3 *Morfologia espermática*

Segundo Billard (1970, apud ALAVI et al., 2007), os espermatozoides podem ser morfológicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 6). Na maioria dos grupos de peixes falta o acrossôma (AFZELIUS, 1978), que ocorre na ordem dos Acipenseriformes (LINHART e KUDO, 1997) e em todos os outros grupos de vertebrados. A morfologia dos espermatozoides parece refletir no seu modo de fertilização. A carência do acrossoma é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do óvulo para a penetração do espermatozoide (GISNBURG, 1972 apud ALAVI et al., 2007). Ginzburg (1972) (apud ALAVI et al., 2007) descreveu os espermatozoides de algumas espécies de peixes como sendo estruturas constituídas, além da peça intermediária e cauda, por cabeça com acrossoma. Todavia, o mesmo autor constatou, por métodos citológicos, que os espermatozoides da maioria dos teleósteos não possuem acrossoma.

Figura 6 – Desenho esquemático de um espermatozoide de peixe



A cauda dos espermatozoides está disposta em arranjos de microtúbulos do tipo “9+2”, significando nove microtúbulos periféricos ao redor de dois centrais. Estes microtúbulos deslizam simultaneamente um após o outro promovendo a oscilação do flagelo e o deslizamento da célula espermática. Cosson (2007 b) descreveu este movimento em todos os seus pormenores.

A cabeça contém o núcleo e, portanto, o material genético. A energia requerida para a motilidade espermática é originada nas mitocôndrias, localizadas na peça intermediária (ALAVI et al., 2009).

Linhart et al. (1991) (*apud* ALAVI et al., 2007) revisou extensamente a literatura e compilou dados de dimensões espermáticas de mais de 30 espécies de peixes: a cabeça mede de dois a quatro μm , com exceção de esturjões e *paddle fishes* (LINHART e KUDO, 1997; PSENICKA et al., 2007), que são alongados e medem 9 μm de comprimento e dois μm de largura, o flagelo atinge de 20 a 100 μm e cada espermatozoide contém de um a nove mitocôndrias.

O estudo morfológico das células espermáticas e sua relação com a infertilidade dos machos alcançaram maior importância com o advento da inseminação artificial em mamíferos, especialmente na espécie bovina. Assim, foram realizados estudos a fim de se evitar a expansão de doenças decorrentes de anormalidades espermáticas, responsáveis pelo baixo índice de fertilidade (BLOM, 1973; BARTH e OKO, 1989; COSSON et al., 1999).

Para a verificação de alterações morfológicas de espermatozoides de mamíferos, inúmeros corantes são utilizados a fim de evidenciar as células espermáticas, como: Williams modificado (VALE FILHO, 1980), coloração de Karras (CBRA, 1998), eosina-nigrosina (CASSINELLO et al., 1998), eosina-anelina azul e corante Giemsa (BARTH & OKO, 1989; CASSINELLO et al., 1998), tinta da China e coloração supravital (HAFEZ & HAFEZ, 2000),

Vermelho Congo (AGUIAR et al., 1994; AGUIAR et al., 1996), Rosa Bengala (RODRIGUES & RODRIGUES, 1998; GALVANI et al., 2000), uranil acetato e citrato chumbo (TADDEI et al., 2001), além de muitos outros.

2.5.2.4 Concentração espermática

A concentração dos espermatozoides no sêmen é frequentemente usada para caracterizar o sêmen. Este parâmetro é facilmente acessado por diferentes técnicas como contagem microscópica, espectrofotometria, e espermatócrito. Segundo Billard et al. (1993) a concentração espermática é um dos principais parâmetros para avaliar a qualidade seminal de peixes. No entanto, Maria et al. (2005) afirmaram que a concentração dos espermatozoides no sêmen não é considerada uma medida específica da capacidade de fertilização e pode variar interespecificamente e ao longo da vida do indivíduo, a época de coleta e o tamanho do peixe, quando são realizadas coletas sucessivas no mesmo indivíduo, se são utilizadas técnicas de indução hormonal e entre diferentes hormônios (GODINHO, 2007; BASTADO et al., 2004; KAVAMOTO et al., 1997; STREIT et al., 2004; BORGES et al., 2005; BILLARD, 1993).

2.5.2.5 Proteínas seminais

Em mamíferos, o sêmen é principalmente composto de espermatozoides e plasma seminal. Este último é uma secreção fisiológica originada de várias glândulas do aparelho reprodutivo masculino (glândulas vesiculares, próstata, glândulas bulbouretrais, além do epidídimo) e apresenta importante função na maturação final dos espermatozoides, além de atuar como veículo dos mesmos no ejaculado (MANN, 1978).

A composição do sêmen varia entre espécies (STRZEZEK et al. 2005; VILLEMURE et al. 2003) e entre indivíduos de uma mesma espécie (STRZEZEK et al. 2005), sendo seus constituintes essenciais para a manutenção do metabolismo espermático, pH e osmolaridade. O aparelho reprodutivo de peixes teleósteos não apresenta glândulas acessórias, ao contrário do que acontece nos mamíferos, e por isso a composição do plasma seminal reflete somente a atividade do ducto espermático e testículo. Além disso, o plasma

seminal em peixes, em contraste com vertebrados superiores, é caracterizado como de baixíssima concentração proteica de 1 a 2 mg por mL (CIERESZKO et al., 2015).

Baseado em investigações conduzidas com mamíferos, proteínas do plasma modulam diversos aspectos funcionais do sêmen, incluindo capacitação, reação acrossômica, proteção, remodelamento da membrana, motilidade e fertilização. Os trabalhos também têm foco no proteoma dos espermatozoides, com a identificação de moléculas que são potenciais marcadores de fertilidade em humanos (MARTINEZ-HEREDIA et al., 2006), touros (MOURA et al., 2006; PEDDINTI et al., 2008; REGO et al., 2014), carneiro (VAN TILBURG et al., 2013), dentre outras espécies (BAKER et al., 2008; AQUINO-CORTEZ et al., 2016).

Em contraste com o amplo conhecimento disponível nas espécies de mamíferos, em peixes estas informações são limitadas, sobretudo devido à própria riqueza de espécies de peixes teleósteos (Actinopterygii), que apresentam mais de 30 mil espécies, o que representa cerca da metade de toda a riqueza de espécies de vertebrados (NEAR et al., 2012).

Estudos pioneiros em peixes realizados por Nynca et al. (2014 a,b) e Dietrich et al. (2014 a,b) descreveram o proteoma de espermatozoides e o plasma seminal de truta arco-íris e carpa, respectivamente. Em ambas as investigações, os autores determinaram quais grupos de proteínas estão presentes e a existência de grande identidade na composição destes proteomas em ambas as espécies, como Transferrina, Apolipoproteína, Tubulina e Creatina quinase.

A análise da composição e função das proteínas do sêmen em peixes cultivados pela aquicultura cria, desta forma, novas possibilidades para a reprodução assistida e tecnologia de criopreservação de gametas (LI et al., 2009; CABRITA et al., 2014).

2.6 Larvicultura de peixes Lutjanídeos

Watanabe et al. (1998), em experimento com cioba (*L. analis*) povoaram tanques de larvicultura no dia da desova dos reprodutores com a microalga *Nannochloropsis oculuta* (150×10^3 células/mL), e cinco dias depois com rotíferos *Brachionus plicatilis* (1,0 indivíduo/ml), juntamente com os ovos fecundados. A alimentação seguiu esta dieta até o décimo dia após a eclosão (DAE), quando foram adicionados nauplios de artemia e no 24º dia a ração comercial foi introduzida no cultivo. As taxas de sobrevivência variaram de 29,3% no 2º dia após a eclosão para 14,3% no 38º dia após a eclosão e o experimento foi considerado bem sucedido na época, com taxas consideradas razoáveis para a família Lutjanidae. Este

modelo de alimentação foi seguido por Turano et al. (2000), em experimento com guaiúba (*L. chrysurus*) e a taxa de sobrevivência foi de 2,8% do estágio de ovos fecundados até juvenis.

Souza (2012) realizou a indução da desova de ariacó, *L. synagris*, mediante tratamento com hormônio hCG, e realizou descrição detalhada do desenvolvimento embrionário e larval da espécie. A alimentação durante o período larval neste trabalho foi constituída de rotíferos (até o 16° DAE), e artêmias (do 17° DAE ao 48° DAE). Estes alimentos são muito utilizados em larvicultura de lutjanídeos, e além deles também são utilizados como alimento vivo, copépodos e larvas de ostras (WATANABE et al., 1998; TURANO et al., 2000; ABDO-DE LA PARRA et al., 2010). Naquela larvicultura de *L. synagris*, a quantidade alimento vivo ofertado nos vinte primeiros dias, foram similares ao utilizados por Watanabe et al. (1998) para *L. analis*, com a mesma fração de tempo, mas não apresentaram resultados semelhantes, visto que a mortalidade atingiu mais de 90% ao fim do 30° DAE, permanecendo neste patamar até o final do 90 DAE. O que não aconteceu com Watanabe et al. (1998), que obtiveram uma taxa de sobrevivência de 14,3% ao final do 38° DAE.

2.7 Desova de peixes Lutjanídeos

As primeiras tentativas de reprodução de lutjanídeos foram feitas por Arnold et al. (1978), que obtiveram uma desova espontânea de *L. campechanus* apenas manipulando fatores físico-químicos como luz e temperatura da água. Dentro da faixa de temperatura que a espécie suporta, é de largo conhecimento que quanto mais quente a água, mais acelerados são os processos fisiológicos. Salinidade é outro parâmetro ambiental que pode influenciar na função reprodutiva. Espécies anádromas, como os salmonídeos, que normalmente desovam em água doce, precisam ser transferidas da água salgada onde se desenvolvem, o que pode ser bastante custoso no caso de grandes plantéis (MYLONAS et al., 2010). O tamanho e forma do tanque, o volume ou profundidade da coluna d'água, assim como a densidade de estocagem podem também influenciar no comportamento de desova.

Para reprodução de peixes marinhos em cativeiro, certas medidas apropriadas devem ser tomadas pelos produtores para permitir que um grupo de peixes cativos se submeta a maturação reprodutiva e desova, e produzam ovos fertilizados (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010).

O sucesso reprodutivo em cativeiro é bastante variável e imprevisível, com alguns reprodutores não desovando durante todo o período reprodutivo, ou quando desovam,

a taxa de fertilização é baixa (WATANABE et al. 2005). Por essas razões a produção de ovos fecundados depende, em grande parte, na maturação de gametas mediante tratamento hormonal e/ou técnicas de reprodução assistida.

As disfunções reprodutivas mais frequentes que afetam a eficiência na produção de ovos fertilizados acometem as fêmeas. Estas disfunções podem variar de falhas na maturação dos ovócitos, na ovulação e/ou desova (MYLONAS et al., 2010). Nos machos a principal preocupação, uma vez que os indivíduos foram capazes de concluir a maturação espermiática e o período de espermição, é a qualidade e a quantidade deste sêmen.

2.7.1 Terapias Hormonais

As terapias hormonais comumente utilizadas em peixes cultivados previnem disfunções fisiológicas tais que impeçam os indivíduos de entrarem no processo de espermição e maturação de ovócitos. Desta forma, são usadas preparações de LH (hormônio luteinizante), que atuará diretamente na gônada do indivíduo, e mais recentemente GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), que estimula a produção endógena de LH no próprio indivíduo (MYLONAS et al., 2010). As preparações de LH podem ser extraídas de extrato purificado de hipófise de peixes maduros durante a estação reprodutiva (comumente carpa e salmonídeos), ou purificadas de placentas humanas, ricas em hCG (gonadotrofina coriônica humana), que, pela grande homologia com a molécula de LH, ativa os mesmos sítios celulares que o hormônio luteinizante (ZOHAR e MYLONAS, 2001; CHOI e SMIRTZ, 2014). Os extratos de hipófise foram os primeiros tratamentos utilizados para a indução à maturação de gametas e desova (ZOHAR e MYLONAS, 2001). O hCG também tem sido bastante utilizado na manipulação hormonal da reprodução, principalmente pela disponibilidade e pela padronização da bioatividade (MYLONAS et al., 2010).

Diversas espécies de lutjanídeos apresentaram resultados positivos no uso de hCG para a indução da desova, tais como *L. campechanus*, *L. argentimaculatus*, *L. synagris*, *L. guttatus*, *L. analis*, *L. peru* (MINTON et al., 1983; WATANABE et al., 1998; ESTUDILLO et al., 2000; EMATA, 2003; PAPANIKOS et al., 2003; DUMAS et al., 2004; BOURQUE e PHELPS, 2007; PHELPS et al., 2009; VUTHIPHANDCHAI et al., 2009; HASTEY et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

Os GnRH e agonistas também são utilizados na indução da maturação de gametas e desova. As principais vantagens sobre os extratos de hipófise seriam a não transmissão de doenças, uma vez que estes preparos são sintéticos, e a atuação fisiológica mais alta no eixo

hipotálamo-hipófise-gônada. Dessa maneira, o GnRH e agonistas induzem a expressão e liberação de gonadotrofinas endógenas além de outros hormônios que podem atuar positivamente sobre a maturação dos gametas e desova (MYLONAS et al., 2010).

Ibarra-Castro e Duncan (2007) obtiveram bons resultados com uso de GnRH α na indução da desova de *L. guttatus*. Neste estudo os autores destacam a dose de 75 μ g, com maior porcentagem de ovos eclodidos (cerca de 86%). Já Ibarra-Castro e Lajonchere (2009) utilizando GnRH α para a indução hormonal desta mesma espécie obtiveram resultados negativos quanto a maturação de ovócitos em fêmeas selvagens e cativas imaturas, e em fêmeas maduras observaram uma relação inversa entre diâmetro do ovócito e dose hormonal. O motivo para tal resultado pode estar baseado na dose infligida ser maior que a suportada e no fato de haver *feedback* negativo no controle hormonal.

Souza (2012) obteve bons resultados com uso de hCG na indução da desova de *L. synagris* distribuídos em três tratamentos com oito repetições cada. Em cada tratamento, as fêmeas receberam doses hormonais distintas de: 1.000, 1.250 e 1.500 UI de HCG por kg de peso corpóreo. A aplicação do hCG nas fêmeas foi dividida em duas doses de 30 e 70% do valor total da dose, intercaladas por 24 horas. Os machos de todos os tratamentos receberam dose única de 500 UI, aplicada na ocasião da segunda dose da fêmea. As fêmeas começaram a desovar entre oito e doze horas após a segunda dose. As fêmeas que receberam a dose hormonal de 1250 UI/kg de HCG foram as que apresentaram o maior número médio de ovos liberados durante a desova. Os ovos fertilizados apresentaram como características: forma esférica, transparência, espaço perivitelínico estreito, córion claro, vitelo homogêneo e não segmentado, sem pigmentação, flutuantes com gota de óleo visível.

2.8 Conservação de sêmen

Muitas vantagens no uso de técnicas de conservação de sêmen de peixes são relatadas. O cultivo intensivo e a propagação artificial de peixes requerem tecnologias próprias de manipulação dos gametas, as quais incluem o armazenamento em curto prazo para facilitar a reprodução artificial ou mesmo para melhorar sua eficácia (KOVÁCS, 1990). Dentre os diversos benefícios da preservação do sêmen, pode-se destacar a exclusão da assincronia de desova entre machos e fêmeas, conservação da variabilidade genética em populações domesticadas e a facilidade no estabelecimento de programas de melhoramento genético (SUQUET et al., 2000; CAROLSFELD et al., 2003; RIBEIRO e GODINHO, 2003).

A preservação de gametas pode ser realizada em curto prazo, que consiste em manter a viabilidade espermática por um período de horas ou dias sob temperatura de refrigeração (OLIVEIRA et al., 2007) e em longo prazo, que envolve procedimentos de armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido, mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (MURGAS et al., 2007). Sob refrigeração, os espermatozoides de peixes podem ser armazenados por algumas horas ou dias, dependendo da espécie, facilitando os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida e favorecendo a concentração dos esforços para o trabalho com as fêmeas (BILLARD et al., 2004). A técnica de refrigeração possibilita ainda a redução nos custos de manutenção do plantel de matrizes e trocas de material genético entre laboratórios (CARNEIRO et al., 2006).

De acordo com Franciscatto et al. (2002), a conservação seminal em curto período de tempo permite que o sêmen esteja apto para a fecundação de ovócitos sem a presença do macho, melhorando a eficiência das reproduções em cativeiro. Já a conservação por longos períodos tem a finalidade de abastecer a necessidade de genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população. O armazenamento de sêmen de peixes por longos períodos de tempo é uma ferramenta importante que possibilita a manutenção da variabilidade genética de uma população para uso futuro (CARNEIRO, 2007).

O ariacó (*L. synagris*) tem sido alvo de investigação acerca de protocolos para a preservação de sêmen por ser um candidato ao desenvolvimento da piscicultura marinha no Brasil (VETTORAZZI et al., 2010; SANCHES et al., 2015)

CAPÍTULO 2 - PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SEMEN DE ARIACÓ (*Lutjanus synagris*, Perciformes) TRATADOS COM GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

3.1. Introdução

O homem ao longo da história tem se preocupado em manter sustentáveis as atividades agrícolas e de extração (FAO, 2011), incluindo a pesca extrativista responsável pela retirada do meio ambiente de milhões de toneladas de animais aquáticos todos os anos. As pescarias de recursos globais têm apresentado declínios em grandes estoques pesqueiros costeiros e oceânicos, pelágicos e de fundo (WORM et al., 2016; KROODSMA et al., 2018). Em contrapartida, as comunidades científicas alertam para a importância da aplicação de técnicas sustentáveis, mas no caso de algumas espécies, é possível dizer que não há mais chance de crescimento da exploração (WORM E TITTENSOR, 2018).

Alimentos de origem marinha são excelentes fontes de proteína animal, e tem sido cada vez mais consumidos, pois são ricos em micronutrientes essenciais, incluindo vitaminas, mineiras, e óleos essenciais da família ômega três, que apresentam propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas, antiarrítmicos e reduzem os lipídeos do sangue. Desta forma, tem havido um esforço cada vez mais intenso em se produzir conhecimento da biologia e fisiologia de espécies de organismos marinhos que são apreciadas como alimento, de modo a proporcionar um contexto propício para retomarmos o controle da produção de alimento de qualidade (KIME et al., 2001).

A aquicultura marinha vem ganhando espaço cada vez maior no segmento econômico de produção de alimento. Sendo a aquicultura, o agronegócio que produz animais aquáticos em ambientes confinados, é elementar que esta atividade domine as técnicas de reprodução mais adequadas fisiológica e economicamente às espécies exploradas (OSTRENKSY et al., 2008).

O estabelecimento do cultivo de uma nova espécie de peixe marinho pela aquicultura deve disponibilizar ovos de qualidade e fornecer um suprimento contínuo de juvenis para a engorda. Com a alta demanda por espécies de peixes vermelhos (da família Lutjanidae), e a constante pressão dos setores de pesca tanto comercial quanto esportiva, uma

fonte alternativa para produção de peixes desta família é a aquicultura (TURANO et al., 2000).

Diversos arranjos foram planejados para as diversas exigências das espécies cultivadas pela aquicultura. Foram melhorados os meios de cultivos (gaiolas circulares, “raceways”, sistemas de alimentação automatizados), otimizados os protocolos de manejo (controle da luminosidade, aplicação de anestésicos, identificação eletrônica individualizada), e foi realizado melhoramento genético (reversão sexual, produção de híbridos), porém ainda restam muitas lacunas a serem preenchidas (SENF, et al., 2018).

A conservação de gametas tem se apresentado como uma ferramenta bastante útil para eliminar assincronias de maturação gonadal entre machos e fêmeas, para a transferência de gametas entre laboratórios, e pode contribuir para a variabilidade genética, que em populações confinadas representa um gargalo a ser contornado (SUQUET et al., 2000; CAROLSFELD et al., 2003; RIBEIRO e GODINHO, 2003).

Para a conservação dos gametas, principalmente os gametas masculinos mais comumente utilizados nesta técnica, é imperativa a adição de substâncias diluidoras e criopreservantes, que confirmam um ambiente propício ao estoque destas células (BILLARD e COSSON, 1992; PADHI e MANDAL, 2000). Para a determinação das condições ótimas que um diluidor ou criopreservante tenha é necessário que se tenha definido os parâmetros seminais. Tanto quanto também é necessário saber em quais condições morfológicas (qualitativas) e morfométricas (merísticas) se encontra o sêmen antes e depois da submissão aos conservantes para gerar um relatório de viabilidade da técnica de preservação empregada.

Desta forma, se torna importante para a aquicultura o estudo da conservação e caracterização de sêmen de peixes que são usados em cultivo, incluindo os peixes vermelhos da família Lutjanidae, que apresentam um grande potencial para serem utilizados na aquicultura marinha no Nordeste Brasileiro, segundo Souza et al. (2016).

3.1.1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi identificar possíveis marcadores moleculares seminais que justifiquem a utilização de hCG na reprodução de ariacó (*Lutjanus synagris*) em cativeiro.

3.1.1.1. Objetivos específicos

- Determinar a motilidade inicial do sêmen fresco;
- Determinar a concentração espermática do sêmen fresco;
- Determinar o volume médio de sêmen produzido por indivíduo;
- Determinar a morfologia dos espermatozoides;
- Determinar quantidade de proteína total no sêmen fresco;
- Determinar a integridade do DNA dos espermatozoides do sêmen fresco de indivíduos induzidos e não induzidos com hCG
- Descrever o proteoma do sêmen fresco utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Identificar as proteínas do sêmen fresco em indivíduos induzidos e não induzidos com hCG;

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Locais de realização do estudo

O presente trabalho foi executado em duas etapas. A primeira dela consistiu na estocagem e maturação exemplares de *L. synagris* e na coleta de sêmen, sendo realizada na Unidade de Pesquisa e Produção Marinha (UPPMAR), localizada no Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC) (Figura 7) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC). O CEAC ($03^{\circ}49' S$; $038^{\circ}25' W$) está localizado próximo a Praia do Porto das Dunas (a 21 km de Fortaleza), situado às margens do estuário do Rio Pacoti, abrangendo uma área de 4,4 ha.

A segunda etapa consistiu na análise do sêmen coletado, tendo sido realizada em sua totalidade no Laboratório de Fisiologia Animal (LFA), do Departamento de Zootecnia, também da UFC.

Figura 7– Vista aérea do CEAC. (A) UPPMAR; (B) Estuário do rio Pacoti.



3.2.2 Captura das matrizes, estocagem e manejo geral

Os exemplares de ariacó, *L. synagris*, foram capturados em várias incursões realizadas próximo à Mucuripe, em Fortaleza, Ceará (03°43' S; 038°30' W). Os animais, juvenis e adultos, foram obtidos por meio de pesca com linhas-de-mão e anzóis, entre março de 2010 e julho de 2011, em diferentes pontos de pesca, sendo as capturas realizadas até uma distância de 10 km da costa, em profundidades variando entre cinco e 35 m.

Ao chegar ao laboratório os indivíduos foram cuidadosamente inspecionados e selecionados segundo a ausência de ectoparasitas e sinais de patologia (presença de ulcerações, exoftalmia, nadadeiras danificadas, dentre outros). Os indivíduos foram em seguida estocados em tanque circular de fibra de vidro com volume útil de 10m³, localizado em um galpão coberto (figura 8), submetidos a um regime de recirculação de água com filtragem mecânica e biológica. A iluminação provinha de um sistema individualizado, constituído por refletores e duas lâmpadas de 160 W mantidos sob fotoperíodo controlado, com 14 horas de claro (05h00min às 19h00min) e 10 horas de escuro.

Figura 8 – Sistema de cultivo coberto na UPPMAR. No detalhe (A) o tanque de estocagem dos reprodutores utilizados neste estudo.



O regime alimentar obedeceu a um trato diário com ração semi-úmida a base de peixe, camarão e concentrado proteico. Para a finalização do processo de maturação gonadal, os peixes foram alimentados uma vez ao dia *ad libitum* alternando-se entre sardinha (*Sardinella* spp.), camarão (*Penaeus* spp.) e lula (*Loligo* sp.).

3.2.3 Obtenção de sêmen

3.2.3.1 Indução hormonal

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, grupo A, com 12 machos ($245,02 \pm 20,14$ g) e sem tratamento hormonal (controle), e grupo B, com 11 machos ($264,75 \pm 22,48$ g) que receberam dose hormonal.

A primeira etapa para a obtenção de sêmen foi a de verificação da condição de maturação gonadal dos peixes. Para tal, a coluna de água do tanque de estocagem era drenada para cerca de 30 cm. Os indivíduos eram capturados com o auxílio de um puçá, e seguiam para a anestesia, que era realizada com banho em água contendo solução estoque de Eugenol a 4%. A solução estoque de anestésico era preparada diluindo-se 100 mL de Eugenol concentrado (Vetec[®]) em 900 mL de álcool etílico 98° (1:9). Os peixes eram mantidos imersos em tanque circular com capacidade de 100L até atingirem o estágio de completa anestesia conforme descrito por Souza et al. (2015).

Após a anestesia, os animais eram medidos com o auxílio de um ictiômetro, pesados em uma balança digital (Bel Instrumentos LTDA.), com precisão de 0,5 cm e 0,1 g, respectivamente (Figura 9), e inspecionados quanto à liberação de sêmen sob leve pressão abdominal (Figura 10).

As induções hormonais foram conduzidas utilizando-se injeções de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Chorulon, Intervet[®]) na base da nadadeira peitoral (figura 11), em dose única. A dosagem utilizada foi de 500UI/Kg de peso corpóreo em cada animal, 24 horas antes da coleta de sêmen.

Figura 9 – (A) Captura dos animais com o auxílio de puçás; (B) Imersão em solução anestésica (Eugenol 4%); (C) e (D) Biometria dos animais, medição e pesagem respectivamente.

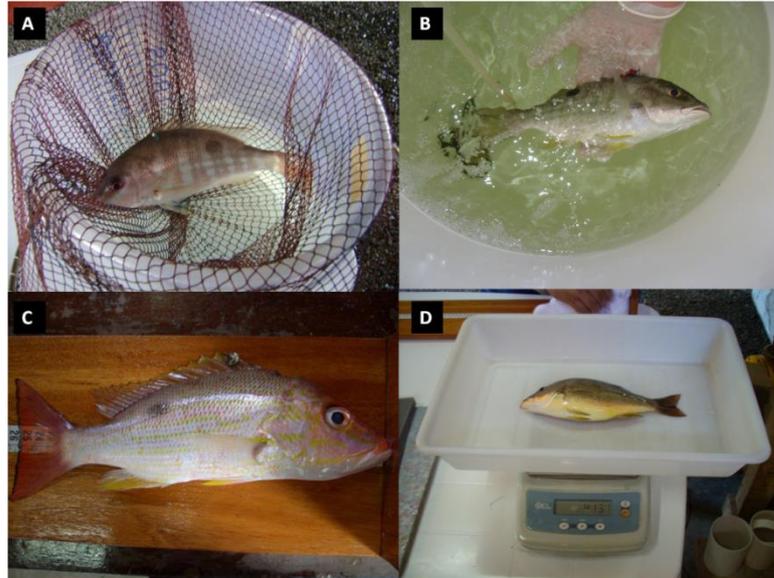


Figura 10 – Aplicação de pressão abdominal para a verificação da presença de sêmen como indicador de maturação gonadal nos machos de *L. synagris*.



Figura 11 – Aplicação de Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG – Chorulon Intervet®) em ariacó (*L. synagris*) para indução à espermição.



3.2.3.2 Coleta de sêmen

Após 24 horas da aplicação da dose hormonal indutora da espermição, os animais foram acessados para a coleta de sêmen. A coleta foi realizada após a anestesia dos reprodutores, como forma de minimizar o estresse dos animais e possibilitar uma maior precisão da técnica de coleta.

A anestesia foi feita como descrita anteriormente, com eugenol a 4%. Os peixes anestesiados eram colocados sobre base acolchoada e envoltos em toalha molhada para evitar qualquer injúria. Aplicava-se a massagem abdominal no sentido ântero-posterior para a extrusão do líquido seminal. Toda a região urogenital era limpa e seca com papel toalha evitando a contaminação do sêmen com fezes, urina ou muco. A coleta foi realizada com a utilização de micropipetas de 200 μ L de volume máximo (Figura 12).

As amostras coletadas eram verificadas quanto à ausência de motilidade espermática por meio de visualização em microscópio ótico (aumento 40x) de uma alíquota da mesma. A amostra só foi estocada para as análises subsequentes quando não havia sinais de ativação espermática e, portanto, de contaminação.

Figura 12 – Coleta de sêmen de ariacó (*L. synagris*) utilizando micropipeta.



Em seguida o conteúdo seminal era transferido para *Eppendorfs* de 2 μ L, individualizados e armazenados em refrigerador, em temperaturas de aproximadamente 4°C.

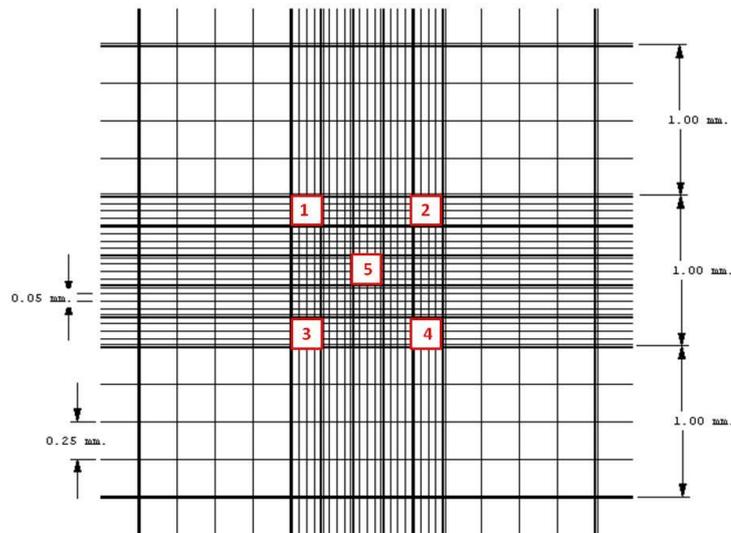
Ao fim da coleta, as amostras eram acondicionadas em caixas térmicas de isopor contendo gelo em escama e, sem contato direto com o gelo, imediatamente transportadas até o LFA - UFC aonde foram feitas as análises.

3.2.4 Análise de sêmen

2.2.4.1 Concentração espermática

A concentração espermática foi acessada em câmara de Neubauer a partir do sêmen fixado em solução de formol salino (0,1%) na proporção de 1:4000 (sêmen: formol salino). Uma alíquota de 10 μ L de sêmen fixado foi colocada sobre cada grade da câmara e levado ao microscópio óptico Nikon®, na objetiva de 40X. As células foram contadas em duplicata por um único observador nos campos 1, 2, 3, 4 e 5 de cada grade de acordo com a Figura 13.

Figura 13 – Esquema de contagem de células espermáticas na câmara de Neubauer. Foram considerados para contagem os quadrantes marcados em vermelho.



Os valores médios encontrados nas duas grades de contagem da câmara de Neubauer (n) foram multiplicados pelo fator de diluição: $n \times 200,05 \times 10^6$

3.2.4.2 Volume de sêmen ejaculado

O sêmen foi coletado com pipetas de 200 μ L de volume máximo. de em seringas plásticas descartáveis de 3 mL e o volume aferido com precisão de 0,1 mL. Este parâmetro foi determinado individualmente de cada espécime.

3.2.4.3 Morfologia

Para a análise de morfologia dos espermatozoides foi necessária a formulação de solução de sêmen fixado em formol salino (0,1%), na proporção de 1:10 (sêmen: formol salino). Para a confecção do esfregaço foi pipetado uma alíquota de 1 μ L de sêmen fixado, o qual foi submetido à coloração com eosina-nigrosina (BJOÈRNDAHL et al., 2003), as lâminas foram submetidas à varredura microscópica para a contagem e caracterização da morfologia e patologias espermáticas. A varredura foi realizada por um único observador.

A classificação das patologias espermáticas foi adaptada da técnica aplicada por Miliorini et al. (2011) para *Prochilodus lineatus* e considerou como patologias primárias os defeitos decorrentes do processo de espermatogênese, e secundárias os defeitos decorrentes da técnica de fixação e/ou esfregaço. A descrição das patologias está apresentada no Quadro 1.

Quando apresentada ambos os defeitos primários e secundários, a célula espermática foi classificada como portador de defeito primário. Quando apresentado mais de um defeito de uma mesma natureza na mesma célula, a classificação foi feita de acordo com o defeito que mais afeta a fertilização (CD> CF>CFE>MC/MIC ou CNL>CSD) (adaptada de Miliorini et al., 2011).

A contagem foi feita utilizando-se um contador manual (Digitimer) que registra até oito categorias. A varredura era interrompida sempre que a contagem total das células atingia média de 200 espermatozoides.

3.2.4.4 Teste de dispersão da cromatina (SCD)

As amostras de espermatozoide foram avaliadas quanto à integridade da cromatina, usando o teste SCD segundo o método descrito por Fernández et al. (2003). Alíquotas (0.1 µL) de sêmen *in natura* foram diluídas em 1,5 mL de PBS e misturadas com agarose aquosa *low-melting* 1% (para obter concentração final de 07%) a 37°C. Alíquotas (50 µL) desta mistura foram pipetadas em uma lâmina com 0,65% de agarose padrão e secas a 80 °C, cobertas com lamínula (24 x 60 mm), e então secas a 48 °C por 4 minutos. As lamínulas foram cuidadosamente removidas e as laminas imediatamente imergidas horizontalmente em uma bandeja com solução desnaturante (0,08 M HCl) por 7 minutos a 25 °C no escuro para gerar os motivos de fitas simples de DNA (ssDNA) derivados da desnaturação. A desnaturação foi parada e as proteínas removidas transferindo-se as lâminas para uma bandeja com solução neutralizadora e de lise (0,2 M Tris-HCl, 2 M β-Mercaptoethanol, 0,5% SDS, 0,02M EDTA, 2 M NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7,0) por 25 minutos em temperatura ambiente. As laminas foram lavadas em água destilada por cinco minutos, desidratadas em anhos sequenciais de etanol (70%, 90% e 100%; 2 minutos cada) e secas ao ar. As células foram coradas com o *kit* Instant Prov (New Prov©) para microscopia de campo claro. Foram avaliados 500 espermatozoides por lamina por um único observador. A presença de halo

circundando o espermatozoide foi considerada indicador de integridade de DNA (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

3.2.4.5 Extração de proteína das amostras de sêmen

Após a retirada de alíquotas para a análise dos parâmetros seminais, o restante das amostras de sêmen foram adicionadas de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, USA) como descrita por Martins *et al.* (2013) e depois congeladas a -20°C . As proteínas do sêmen de ariacó foram extraídas usando Triton X-100 (1:10, detergente: PBS) e manualmente maceradas com pistilo para a lise celular (1:1, detergente: amostra), adaptando o protocolo originalmente descrito por van Tilburg *et al.* (2013) (Figura 14).

Figura 14 – Pistilo utilizado na maceração do sêmen de ariacó.



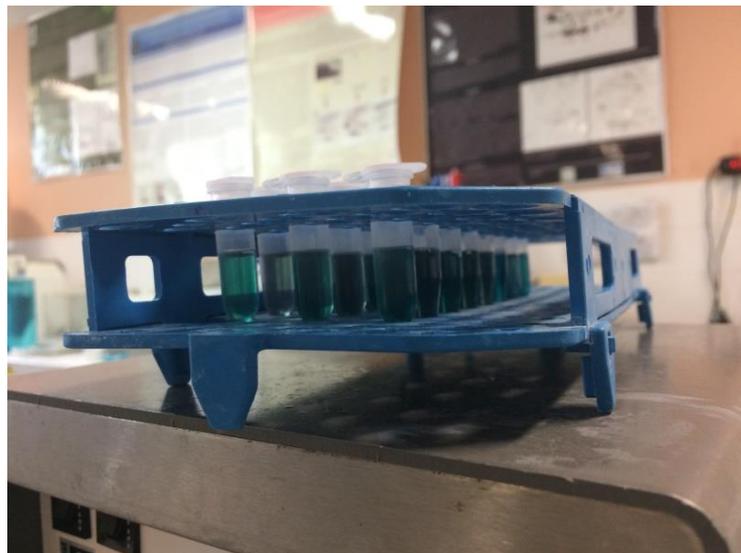
As amostras foram sonicadas por 10 minutos e então centrifugadas a $8000 \times g$ (45 min, 4°C). As proteínas foram precipitadas em acetona gelado (9:1, acetona: amostra) *overnight* e então centrifugadas ($5000 \times g$, 15 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. As proteínas foram ressuscendidas em tampão de amostra (0,125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% (v/v) glicerol, 0,2 M DTT) e as amostras foram mensuradas em triplicata, após a diluição na

proporção de 1:5 (v/v) em água milli-Q (Millipore,USA). A concentração de proteínas solúveis foi medida de acordo com Bradford (1976) (VAN TILBURG et al., 2013; Figura 15).

3.2.4.6 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) das proteínas do sêmen

Alíquotas de 15 µg de proteína, obtidas do sêmen de ariacó, foram adicionadas de tampão de corrida (0,125M Tris-HCl, 20% (v/v) glicerol, 4% (w/v) SDS, 0,02% azul de bromo fenol, pH 6,8), aquecidas (95°C, 90 s) e aplicadas em gel de poliacrilamida 12.5% (RODRIGUEZ-VILLAMIL et al., 2016). Logo em seguida o gel foi posicionado em cuba *Ruby Standard Vertical Unit* (GE Healthcare Lifesciences, USA; Figura 16) e submetido à corrente elétrica a 500 V, 90 W, 25 mA/gel. Após o término da eletroforese, as proteínas presentes no gel foram coradas com azul de Coomassie coloidal e descoradas em metanol e ácido acético, como descrito em detalhes por Rodriguez-Villamil et al. (2016).

Figura 15 – Amostras de sêmen de ariacó coradas com reagente de Bradford (1976) para dosagens das proteínas totais.



Quadro 1 - Descrição das patologias analisadas em espermatozoides de ariacó (*L. synagris*) (adaptada de Miliorini et al., 2011).

Natureza da Patologia	Tipo de Patologia	Descrição
Primária	Macrocefalia (MC)	Espermatozoides apresentando cabeça grande
	Microcefalia (MIC)	Espermatozoides apresentando cabeça pequena
	Cabeça degenerada (CD)	Cabeça, livre ou não, apresentando contorno irregular
	Cauda defeituosa (CF)	Cauda com fratura e ausência da porção final
Secundária	Cabeça normal livre (CNL)	Cabeça sem cauda, sem alteração da forma
	Cauda com simples dobra (CSD)	Todas as dobras da cauda, exceto as enroladas em si mesmas ou ao redor da cabeça

Figura 16 – Cuba vertical de eletroforese *Ruby* (GE Healthcare Lifesciences, USA) no Laboratório de Fisiologia Animal, UFC.



3.2.4.7 Análise das imagens dos géis 1D

Os géis foram escaneados em imagens com 300 dpi (Image Scanner II; GE Lifesciences, USA), salvos em formato de imagem (.tif) e analisados usando o software *Quantity One* v.4.6.3 (BioRad, USA) de acordo com o protocolo descrito por Martins et al. (2013) e Rodriguez-Villamil et al. (2016). O número e intensidade das bandas proteicas no gel foram determinados com as especificações do software.

3.2.4.8 Digestão das proteínas

As bandas proteicas identificadas pelo software *Quantity One* foram cortadas dos géis 1-D, em pedaços cúbicos de 1-mm² e submetidos a digestão com tripsina (van Tilburg et al., 2013; Rodriguez-Villamil et al., 2016; Figura 17). As frações de gel foram transferidos para tubos de 1,5-ml e descorados por incubação em acetonitrila (ACN) 50% em 25 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,0 por 45 minutos, a 37°C. Após o descoramento, as frações de gel foram equilibrados com 10 mM DTT e 100mM de bicarbonato de amônio por 30 minutos para a redução dos resíduos de cisteína. Para a alcalinização das proteínas, as amostras foram incubadas em solução de 50 mM de iodoacetamida em 100 mM de bicarbonato de amônio, em temperatura ambiente por 30 minutos. As frações de gel foram desidratadas em ACN 100% e secas. As frações de gel desidratadas foram tratadas com tripsina (Promega, Madison, WI, USA) diluída em 50mM de bicarbonato de amônio (20 ng/μL) e encubados *overnight* a 37°C. O sobrenadante foi coletado e preservado. A solução de peptídeos e tripsina foi extraída do gel com 30 μl de ácido fórmico 5%, ACN 50% e as frações combinadas e secas usando um concentrador *SpeedVac* (Concentrator Plus, Eppendorf, USA).

3.2.4.9 Identificação das proteínas usando espectrometria de massa (ESI-Q-ToF) e pesquisa de dados

Os peptídeos foram separados em coluna C18 BEH300 (100 μm \times 100 mm) usando o sistema nanoAcquity™ (Waters Corp., USA) e eluídos a 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ com gradiente de acetronitrila (5–85%) contendo 0,1% de ácido fórmico. O sistema de cromatografia líquida foi conectado a uma fonte de espectrometria de massa nanospray (SYNAPT HDMS system, Waters Corp., USA). O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo usando capilar a 90°C e voltagem de 3,5 kV.

Figura 17 – Excisão das bandas de proteínas do sêmen de ariacó dos géis de poliacrilamida.



A calibração do instrumento foi realizada utilizando fragmentos de [Glu1]-fibrinopeptídeo B duplamente protonado (m/z 785,84), e o Lock-mass usado durante aquisição foi o íon intacto. O procedimento LC-MS/MS foi feito de acordo com o método de aquisição de dados-dependente (DDA), selecionando MS/MS de íons precursores de dupla ou tripla carga. Os íons foram fragmentados por dissociação de colisão induzida usando argon como gás de colisão e rampa de energia de colisão que variou de acordo com o estado de

carga do íon precursor selecionado. A coleta dos dados foi feita num alcance de m/z de 300–2100 para a amostragem de MS (1escaneamento/s), identificando íons com m/z variando entre 50–2500 for MS/MS. Os dados foram coletados com o software *MassLynx* 4.1, processados utilizando o servidor *Protein Lynx Global Server 2.4* (Waters Corp.) e foram convertidos em arquivo de texto de lista de picos ou procura de banco de dados. Os dados foram submetidos ao servidor *Mascot* (Matrix Science, London, UK, v.2.6) e associados aos bancos de dados *NCBIprot* e *SwissProt* para *Actinopterygii*. As buscas foram feitas de acordo com o critério seguinte: perda de no máximo uma clivagem tríptica, peptídeos monoisotópicos com carga de +1, +2 e +3, com oxidação de resíduos de metionina variável e variação fixa de resíduos de cisteína carbamidometilados usando modo de busca íon espectro MS/MS. A tolerância utilizada para massa de peptídeo e fragmento de massa foi $\pm 1,2$ Da e $\pm 0,6$ Da, respectivamente.

3.2.4.10 Ontologia gênica

Depois da identificação no servidor *Mascot*, as proteínas do sêmen de ariacó foram listadas sob seu nome de acesso no banco de dados *UniProtKB* e analisado usando o software *STRAP*, v.1.5.0.0. As informações sobre processos biológicos, função molecular e componente celular foram obtidas do banco de dados *UniProtKB* (BHATIA et al., 2009; REGO et al., 2014).

3.2.4.11 Análise de interação das proteínas

A rede de interação proteína-proteína foi obtida do banco de dados *STRING* (<http://string-db.org>), versão 10.0 (SNEL et al., 2000). Este banco de dados consiste de interações conhecidas e preditas coletadas de associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). As análises de interações foram feitas para creatina quinase, tubulina, principal proteína do plasma seminal (PSP-I), ubiquitina carboxi-terminal hidrolase-5, proteína de choque térmico 90 (HSP90) e transferrina. Foi aplicado STRING em até dez interações e confiança média, usando homem e peixe como espécies.

3.2.5 Análise estatística

Os dados de volume de sêmen, motilidade e concentração espermática, integridade de cromatina, concentração de proteínas do sêmen, número de bandas por trilha e intensidade de bandas dos géis 1-D foram testados quanto à normalidade usando o teste Shapiro-Wilk com o software *GraphPad Prism*, 7.02. Foram feitas transformações logarítmicas ($\text{Log}(x+1)$) ou angulares ($\text{Arcsine}(\sqrt{x/100})$) quando necessárias. Os dados foram submetidos à análise de variância e as medias das variáveis foram comparadas entre os grupos pelos testes t de Student ou Tukey usando o software *Statview statistics Software*, versão 5.0 (SAS Institute Inc. 2000).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 *Obtenção de sêmen*

3.3.1.1 *Indução hormonal*

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) se mostrou eficaz na indução da espermiacção do ariacó, *L. synagris*. O hormônio hGC tem sido amplamente utilizado para induzir o término da maturação de peixes teleósteos de água doce (LEONARDO et al., 2004, LEVAVI-SIVAN et al., 2004) e de água salgada (MATSUYAMA et al., 1998, WATANABE et al., 1995, CAYLORA et al., 1994, LEU & CHOU, 1996; SCHIAVONE et al., 2006). Previamente, exemplares de *L. synagris* já haviam sido alvo de testes com este hormônio, tendo tido sucesso na obtenção de ovos fertilizados (PASSOS NETO, 2010; SOUZA, 2012; SOUZA et al., 2015; 2016).

3.3.1.2 *Coleta de sêmen*

As coletas de sêmen realizadas no presente estudo, após 24 horas da aplicação da dose hormonal indutora da espermiacção, foram bem sucedidas. As massagens abdominais como forma de extrusão de sêmen, não removem todo o líquido seminal dos testículos e ducto espermático, porém é o método mais utilizado em peixes cultivados (CAMPBELL et al., 1992; SANSONE et al. 2002; GAGE et al., 2002; DEGRAAF & BERLINSKY, 2004; SCHIAVONE et al., 2006; TUSET et al., 2008; GROISON et al., 2010a). A remoção dos testículos (YANG et al., 2006; TIERSCH et al., 2004; RILEY et al., 2004) também é utilizada para análises, porém implica, obviamente, na morte dos espécimes.

3.3.2 Análise de sêmen

3.3.2.1 Concentração espermática e volume de sêmen e teste de dispersão de cromatina

As concentrações espermáticas médias do sêmen de ariacó entre animais que receberam doses de hGC e os que não receberam (grupo controle) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores obtidos foram de $0,52 \pm 1,38 \times 10^{10}$ espermatozoides/mL no grupo controle e $2,56 \pm 0,12 \times 10^{10}$ espermatozoides/mL nos animais tratados com hCG (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros seminais (valores médios \pm S.E.M.) em ariacós adultos do grupo controle e tratado com hCG. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística por one-way ANOVA ($p < 0,05$) e Mann Whitney ($p < 0,05$).

Parâmetros seminais	Controle	Tratados com hCG
Concentração de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$1,61 \pm 0,24^a$	$2,87 \pm 0,37^b$
Volume (μL)	$232,72 \pm 44,42$	$270,91 \pm 59,11$
Motilidade (%)	$69,11 \pm 9,19$	$78,19 \pm 6,72$
Concentração espermática ($\times 10^{10}/\text{mL}$)	$0,52 \pm 1,38^a$	$2,56 \pm 0,12^b$
Morfologia normal (%)	$40,3 \pm 1,65^a$	$57,6 \pm 3,13^b$
Integridade de cromatina (%)	halo	$81,8 \pm 6,25$
	sem halo	$18,85 \pm 6,21$
	degradação	$0,05 \pm 0,05$
		$91,3 \pm 4,03$
		$8,7 \pm 4,03$
		0 ± 0

A concentração encontrada por Sanches e Cerqueira (2010) para a mesma espécie foi menor: $2,2 \pm 0,2 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Os espécimes utilizados neste trabalho foram mantidos em sistema de recirculação coberto, enquanto que os analisados por Sanches e Cerqueira (2010) estiveram submetidos às condições marinhas da costa de Ubatuba-SP, o que pode ter influenciado na maior hidratação do sêmen e, conseqüentemente, em uma menor concentração espermática. O tratamento com gonadotrofina coriônica humana pode ter influenciado não só a concentração espermática, mas também a porcentagem de espermatozoides normais no sêmen de ariacó. A mesma espécie foi estudada previamente por

Gaitán-Espitita et al. (2013), que reportaram uma concentração espermática mais baixa ($0,13 \pm 0,04 \times 10^{10}$ por mL) do que a encontrada no presente estudo para o grupo controle, que não recebeu tratamento hormonal ($0,52 \pm 1,38 \times 10^{10}$ por mL). Diferenças no ambiente, nutrição, idade e peso podem afetar os aspectos fisiológicos em peixes.

Em outra espécie de lutjanídeo, *L. argentimaculatus* (VUTHIPHANDCHAI et al., 2009) o valor de concentração espermática foi bastante similar ao encontrado neste estudo e variou entre $1,3 \times 10^{10}$ e $2,8 \times 10^{10}$ espermatozoides/mL. Em outras espécies do mesmo gênero *Lutjanus* estes valores foram menores: *L. peru* (CAMPOS, 2006), quando foi aplicada dose de LHRHa, $4,8 \times 10^9$ espermatozoides/mL; e *L. campechanus* (RILEY et al., 2004), $1,0 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Estes dados demonstram que há variação da concentração espermática entre espécies diferentes. Portanto, de acordo com Billard et al. (1995), ao se trabalhar com reprodução assistida de peixes, deve-se sempre avaliar este parâmetro, já que influencia de sobremaneira na fertilização.

Tiba et al. (2009), ao trabalharem com robalo, *Centropomus parallelus*, obtiveram resultado de $2,5 \times 10^{10}$ espermatozoides/mL, enquanto Suquet et al. (2010) trabalhando com atum do Atlântico, *Thunnus thynnus*, obtiveram $3,8 \pm 1,3 \times 10^{10}$ espermatozoides/ml. Já as concentrações espermáticas da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* (SANCHES et al., 2008) e de *Merluccius merluccius* (GROISON et al., 2010) apresentaram valores de $2,9 \pm 0,4 \times 10^9$ e $6,6 \pm 3,2 \times 10^9$ espermatozoides/mL, respectivamente.

Fauvel et al. (1999) atestaram que em peixes marinhos a concentração espermática decresce durante a estação reprodutiva. Já Rouxel et al. (2008) relataram um aumento nas concentrações espermáticas em bacalhau da espécie *Gadus morhua* L., seguido de um decréscimo durante a estação reprodutiva. Estes autores sugeriram que a diferença encontrada dentro da estação reprodutiva poderia ser devido ao envelhecimento das células espermáticas durante uma espermição descontínua. Estudos que avaliem a concentração espermática ao longo da estação reprodutiva são de grande importância para a obtenção de bons resultados quando da realização de reprodução assistida, indicando não somente quais espécies utilizar, mas a melhor época de acasalar.

O volume médio de sêmen obtido das amostras de *L. synagris* no presente trabalho foi de $0,39 \pm 0,2$ mL. Sanches e Cerqueira (2010), em experimentos de resfriamento de sêmen de *L. synagris*, cultivados na costa de Ubatuba-SP, reportaram que o volume médio de sêmen ejaculado foi de $0,61 \pm 0,35$ mL, sendo um pouco superior ao obtido nas presentes análises, porém se ponderados os valores de desvio padrão podem ser considerados similares.

Em se tratando de parâmetros que se correlacionam, como volume e concentração espermática, é esperado que quanto mais hidratado esteja o sêmen (maior volume) menos concentrado ele seja. E em se comparando indivíduos mantidos em cativeiro e em ambiente natural, o esperado é que aqueles estocados na natureza apresentem melhores índices seminiais. Porém, quando utilizado tratamento hormonal (manipuladas as condições fisiológicas) a qualidade seminal dos animais estocados em tanques tende a ser semelhante à daqueles estocados na natureza. O contraste dos valores médios de volume de sêmen ejaculado entre os espécimes do presente trabalho (estocados em tanques cobertos) e os utilizados por Sanches e Cerqueira (2010) (estocados em tanques-rede na costa paulista) demonstram a superioridade do ambiente natural em relação à qualidade fisiológica dos peixes.

Segundo Vulthiphandchai et al. (2009), o volume expressivo coletado para *L. argentimaculatus* variou entre 0,6 e 3,1 mL. Para *L. peru* (CAMPOS, 2006), o volume médio coletado após indução hormonal com LHRHa foi de $3,13 \pm 1,04$ mL, valor bastante acima dos encontrados para *L. synagris* no presente estudo.

O volume de sêmen ejaculado em *E. malabaricus*, reportado por Chao et al. (1992), foi menor que 0,5 mL, tendo sido similar ao valor médio apresentado para *L. synagris* no presente estudo. Sanches et al. (2008), obtiveram valores de 12 mL para garoupas *E. marginatus*, bastante superiores aos encontrados em por Chao et al. (1992) para *E. malabaricus* e aos valores obtidos para *L. synagris* no presente estudo. O volume médio encontrado para *M. merluccius* (GROISON et al., 2010b) foi de 3,9 e 2,6 mL para espécimes da Noruega e França, respectivamente. O volume de sêmen ejaculado pelo atum *T. tynnus* (SUQUET et al., 2010) variou entre 0,1 - 5 mL, valores também superiores aos obtidos para *L. synagris* no presente trabalho.

Neste estudo, o hCG não influenciou a integridade da cromatina. Ambos os grupos tratados e controle apresentaram altas porcentagens de integridade de DNA ($91,3 \pm 4,03\%$, e $81,8 \pm 6,25$, respectivamente). Ainda assim, mesmo com algum nível de fragmentação de DNA, espermatozoides podem fertilizar óvulos, em humanos, mas os embriões não se desenvolvem (SPEYER et al., 2010). Os danos em cromatina são pouco considerados na análise de qualidade de sêmen (CABRITA et al., 2014). A descrição realizada no presente estudo foi a primeira descrição da integridade de DNA no sêmen de ariacó.

3.3.2.2 Morfologia

Os resultados das análises morfológicas mostraram um percentual de 41,15% de espermatozoides normais de *L. synagris*, que apresentavam cabeça circular, sem acrossoma e um único flagelo (Figura 18 (a)). As anormalidades e suas ocorrências estão mostradas na Figura 18 (b – h).

O percentual de defeitos ou danos primários observados neste estudo foi 34,6%, e o de danos secundários foi de 24,25%. O percentual de deformidades presentes nos espermatozoides de *L. synagris* não diferiram estatisticamente entre os grupos tratados com hCG e controle (Figura 19). Segundo Rurangwa et al. (1998) as deformidades morfológicas estão associadas com deficiências funcionais e influenciam negativamente a motilidade espermática e conseqüentemente a habilidade de fertilização.

Trabalhos explorando a morfologia dos espermatozoides e suas patologias para peixes marinhos ainda são raros. Streit Jr. et al. (2009), analisando os efeitos do congelamento no sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, encontraram uma média de 59,87% de espermatozoides *in natura* apresentando pelo menos uma patologia, sendo que destes, 46,73% apresentaram pelo menos uma patologia primária e 13,14% pelo menos uma patologia secundária. Em relação ao ariacó, o percentual de patologias total encontra-se bastante parecido ao percentual encontrado em pacu. Galo et al. (2011), em trabalho com piracanjuba, *Brycon obgnyanus*, encontraram um percentual de $62,20 \pm 17,86$ de espermatozoides normais, no sêmen *in natura*, valor acima do encontrado para *L. synagris*.

Figura 18 – Morfologia dos espermatozoides de ariacó. Fotografias de microscopia óptica (x 60) de danos primários (b-f) e secundários (f-g). (a) Espermatozoide normal. (b) Macrocefalia; (c) microcefalia; (d) cabeça degenerada; (e) cauda degenerada; (f) cabeça livre e (g) cauda com simples dobra.

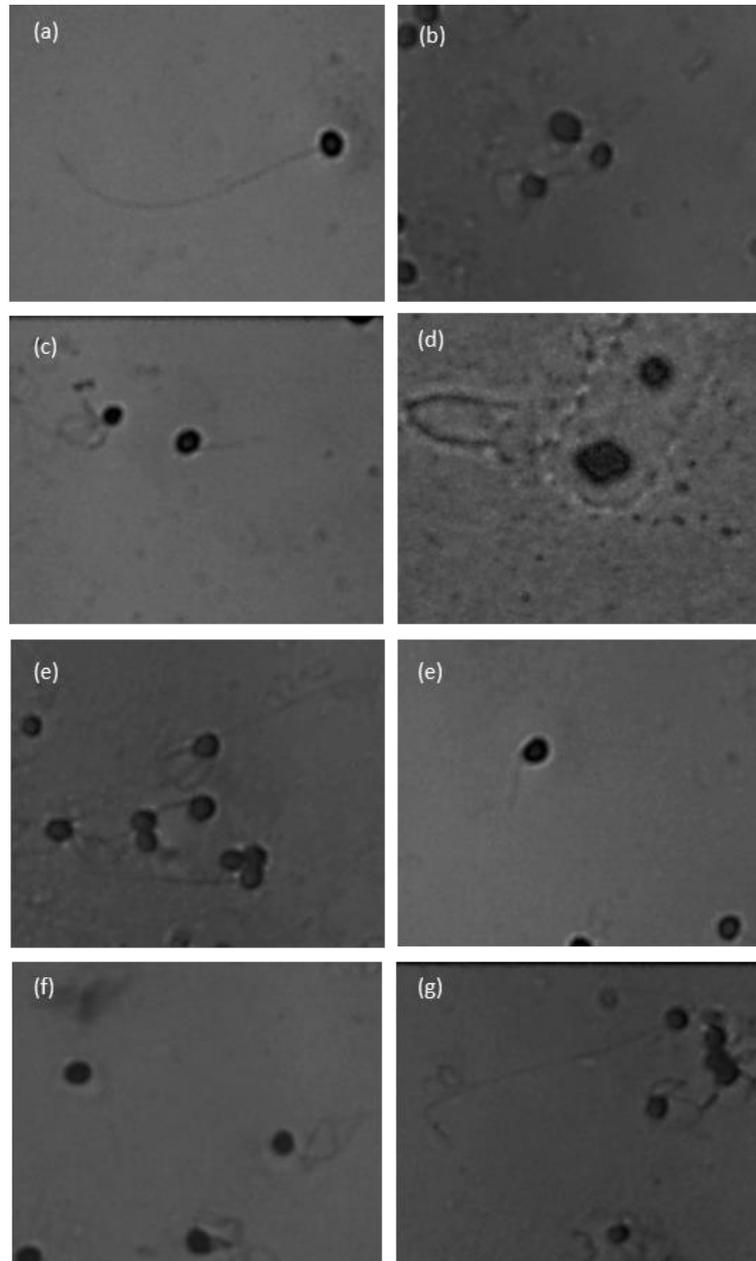
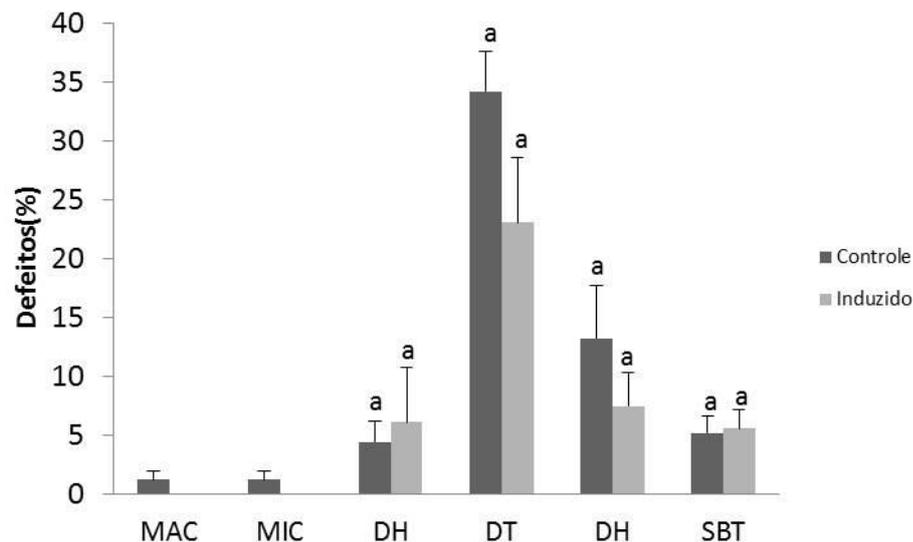


Figura 19 – Defeitos morfológicos encontrados em espermatozoides de ariacó, nos grupos controle e tratados com hCG. Colunas em cinza escuro representam o grupo controle e em cinza claro o grupo induzido. As barras indicam a média \pm S.E.M. MAC, macrocefalia; MIC, microcefalia; HD, cabeça degenerada; DT, cauda defeituosa; DH, cabeça livre; SBT, cauda com simples dobra. Letras iguais representam que não houve diferença estatística.



Lesões na cabeça do espermatozoide, como edemas, relatado por Cosson et al. (1999), estão relacionadas a um meio hiposmótico, em que a osmolaridade do meio diluidor é a principal responsável pelas injúrias provocadas nas caudas e na cabeça dos espermatozoides. Então, pode-se supor que a macrocefalia observada no presente estudo tenha surgido devido a um possível choque osmótico atribuído ao fixador utilizado neste trabalho, embora não tenha sido verificada sua osmolaridade.

Embora as técnicas de coloração possam produzir alterações morfológicas, ou mascarar defeitos no núcleo espermático, as anormalidades geralmente são melhores detectadas com a aplicação destas técnicas (CHACÓN, 2001).

O formato e tamanho da cabeça dos espermatozoides pode ser um dos pré-requisitos para a penetração na micrópila (GINZBURG, 1972). Diferentes formatos de cabeça são encontrados para teleósteos (ALAVI et al., 2009). De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) existem valores máximos desejáveis para anomalias morfológicas não interferirem nas taxas de fertilização para equinos e bovinos 30%; para carneiros e para javalis 20%. Entretanto, não existem valores definidos para peixes.

O tratamento com gonadotrofina coriônica humana também influenciou a porcentagem de espermatozoides normais no sêmen de ariacó aqui obtidas. Guzmán et al. (2011) observaram que em comparação com animais controle, a solha senegalesa tratada com hCG apresentava testículos com mais cistos contendo espermátócitos, espermátides maduras e espermatozoides na medula do ducto seminal. Os resultados obtidos estudo citado anteriormente indicaram que o hCG estimulou certas fases da espermatogênese em solha senegalesa. É possível que um mecanismo similar tenha ocorrido nos ariacós utilizados no presente estudo, afetando a normalidade morfológica nas amostras de sêmen.

Outras espécies endêmicas do Brasil também foram estudadas quanto à morfologia dos espermatozoides, tais como: *Prochilodus lineatus* (KAVAMOTO et al., 1999), *Piaractus mesopotamicus* (STREIT Jr. et al., 2006), *Leporinus macrocephalus* (MORAES et al., 2004), *Rhamdia quelen* (BOMBARDELLI et al., 2006), *Salminus maxillosus* (STREIT Jr et al., 2008a), *Leporinus elongates* (STREIT Jr et al., 2008b) e *Colossoma macropomum* (MARIA et al., 2012). Maria et al. (2012) observaram que, quando induzidas com extrato de pituitária de carpa (EPC), os espermatozoides de *Colossoma macropomum* tinham significativamente menos anormalidades morfológicas (15%) do que os não tratados (25%).

O tratamento com hCG não influenciou o volume de sêmen, nem a motilidade espermática nos ariacós do presente estudo, apesar dos efeitos positivos na concentração espermática e morfologia. Mesmo que o volume seminal não tenha sido estatisticamente diferente no sêmen de ariacós tratados com hCG, mesmo uma pequena hidratação do sêmen causada pelo efeito do hormônio pode facilitar a extrusão dos espermatozoides no momento da coleta e reduzir danos, de acordo com Schulz e Miura (2002).

Apesar de serem compostos diferentes, ambos hCG e LH têm similaridades em estrutura, função e interação com um receptor comum, e são, por isso, considerados equivalentes quando utilizados em tratamento de fertilidade (CHOI & SMITZ, 2014). Já foi reportado que o tratamento com hCG ativa as células de Leydig e Sertoli, juntamente com a proliferação de espermatogônias, meiose e espermiogênese em enguias europeias e japonesas (COLOMBO et al., 1987; MIURA et al., 1991). Neste estudo, hCG mostrou eficácia em gerar espermatozoides normais, possivelmente por atuar nas vias metabólicas pelas quais as células de Sertoli e de Leydig mantêm um microambiente adequado para a ocorrência da espermatogênese e espermiogênese.

3.3.2.3 Proteínas do sêmen

As concentrações de proteínas no sêmen de ariacós tratados com hCG e não tratados foi significativamente diferente ($p < 0,05$) $2,87 \pm 0,37$ e $1,61 \pm 0,24$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente. Trinta e dois tipos de bandas foram detectadas nos géis 1-D de proteínas do sêmen de ariacó em ambos os grupos, controle e tratados com hCG, com a identificação de 71 proteínas diferentes (Figura 20, Tabela 2, Tabela Suplementar 1). As proteínas identificadas nas bandas com maiores intensidades incluem Creatina quinase, Tubulina, Proteínas de choque cognato 71, Proteína de choque térmico 60, Peroxirredoxina 1 e 3, dentre outras (Tabela 2). A lista completa das proteínas identificadas, seu peso molecular, número e sequência de peptídeos está contida na Tabela suplementar 1. O sêmen dos peixes tratados com hCG apresentou mais bandas do que o do grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, cinco bandas diferentes tiveram maior intensidade nos animais induzidos com hCG do que nos do grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 21).

Cada amostra de sêmen apresentou até 32 bandas nos géis 1-D de proteínas do sêmen de ariacó. A aparência das bandas foi diferente entre os animais. A frequência de presença de cada banda variou de 16,7%, em um peixe não tratado, para 100% em nove peixes tratados com hCG.

A abordagem proteômica do presente estudo, combinando SDS-PAGE 1-D e espectrometria de massa, permitiu a identificação das principais proteínas presentes no sêmen de *Lutjanus synagris*. Além disso, existem diferenças significativas no proteoma do sêmen de ariacó como resultado do tratamento com hCG. Estudos anteriores investigaram aspectos da qualidade do sêmen de ariacó (GAITÁN-ESPITIA et al., 2013; SANCHES et al., 2015), mas o presente trabalho foi o primeiro a relatar o perfil proteômico do sêmen de exemplares de *L. syangris*.

Figura 20 – Sêmen de ariacó separado por SDS-PAGE unidimensional (12,5% acrilamida). Pontos pretos indicam os tipos de bandas individualmente submetidas à ESI-QUAD-TOF. MW- peso molecular (220-14 KDa). As proteínas foram coradas com azul de Coomassie R-250. Cada trilha representa uma amostra de um único animal.

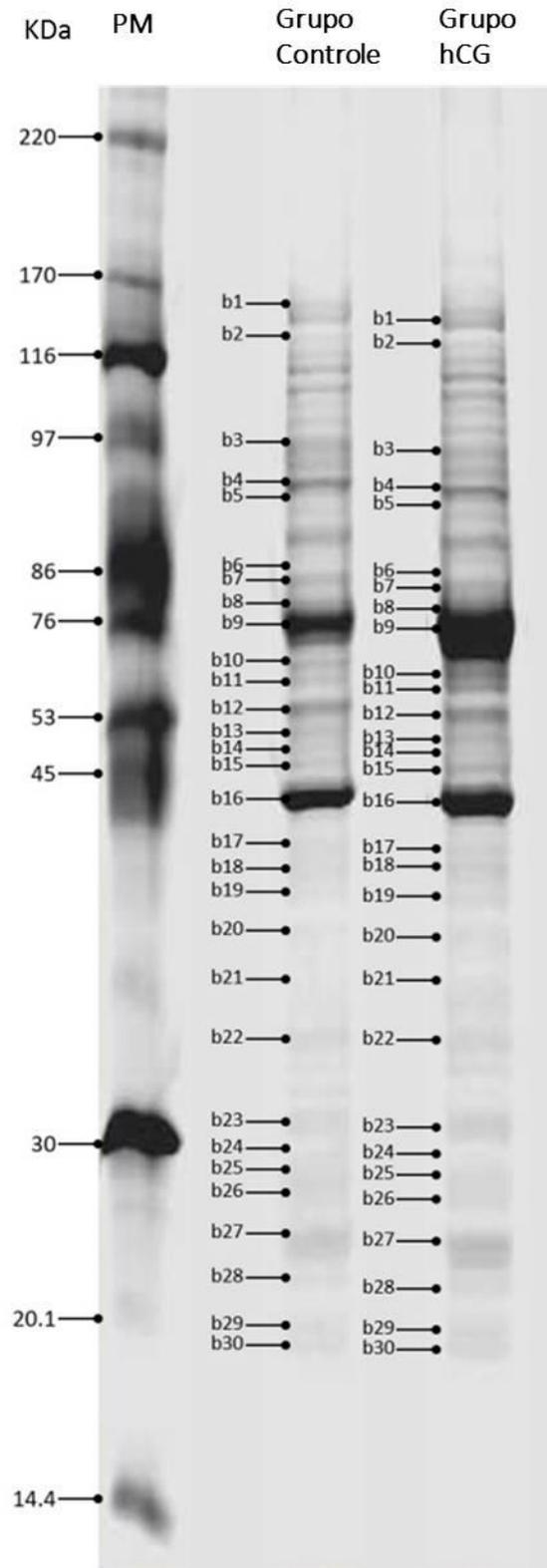


Tabela 2 – Bandas mais intensas e identificação das proteínas do sêmen de ariacó (grupo controle e tratado com hCG), seus pesos moleculares, função molecular segundo *Ontologia gênica* e abundância relativa baseada na intensidade do pico do géis 1D SDS-PAGE, como mostrado na figura 20.

Tipo de Banda	Peso Molecular (KDa)	Pico de Intensidade Média (pix)	Proteína	Função Molecular
Grupo Controle				
			40S ribosomal protein S4	Composto ligante heterocíclico; componente estrutural do ribossomo.
24	44,20	10 684 556	DNA helicase MCM9	Ligante derivado de carboidrato; composto ligante heterocíclico; atividade catalítica; atividade hidrolase.
			Brain creatine kinase b Creatine kinase B-type isoform X2 Creatine kinase, testis isozyme isoform X1	Ligante derivado de carboidrato; atividade catalítica, atividade transferase; ligante protéico.
12	80,21	4 231 000	Heat shock cognate 71 kDa protein (6)	Ligante derivado de carboidrato
15	69,20	3 548 800	Collagen alpha2(I) chain	Atividade molecular estrutural, constituinte da matriz

				extracelular; ligante iônico.
			Tubulin alpha chain	Ligante, ligante derivado de carboidrato; atividade catalítica,
			Tubulin alpha chain, testis specific	atividade hidrolase; atividade estrutural molecular,
			Tubulin beta-1 chain	constituente estrutural do citoesqueleto.
			Tubulin beta-1 chain	Ligante, ligante derivado de carboidrato; atividade catalítica,
			Tubulin alpha chain , testis-specific	atividade hidrolase; atividade estrutural molecular,
16	64,53	3 165 667		constituente estrutural do citoesqueleto.
			Glutamate dehydrogenase, mitochondrial	Ligante derivado de carboidrato; atividade oxidoreductase; ligante proteico; ligante iônico; ligante cofator
			Stress induced phosphoprotein-1	Atividade reguladora enzimática; ligante proteico
			Wap65-2 precursor	
			Wap65-2	Transportador, atividade transportadora de cofactor, ligante
14	72,10	2 056 167	Warm temperature acclimation related-like 65kDa protein	iônico.
			Heat shock protein 60	Ligante derivado de carboidrato; ligante proteico; ligante composto heterocíclico; atividade de hidrolase.

Grupo induzido hCG

24	44,52	26 162 909	Creatine kinase B-type isoform X1	Ligante derivado de carboidrato; atividade catalítica, atividade transferase; ligante proteico.
			Creatine kinase B-type isoform X2	
			Creatine kinase, testis isozyme isoform X1	
			Creatine kinase M-type-like	
12	80,21	7 234 182	Protein disulfide-isomerase A4	Atividade catalítica, atividade isomerase.
38	26,43	7 317 333	Proteasome subunit beta type-6-like	Atividade catalítica, atividade de hidrolase.
			Peroxiredoxin 1	Atividade antioxidante, atividade peroxiredoxina.
			Peroxiredoxin 3	
			Novel protein similar to human member of RAS oncogene family (RAB35)	Ligante, ligante derivado de carboidrato.
			Ras-related protein Rab-1B	
			Ras-related protein Rab-15, isoform X1	
Ras-related protein Rab-35 isoform X1				
			ATP synthase F(0) complex subunit	Transportador, atividade transportadora substrato-especifica;

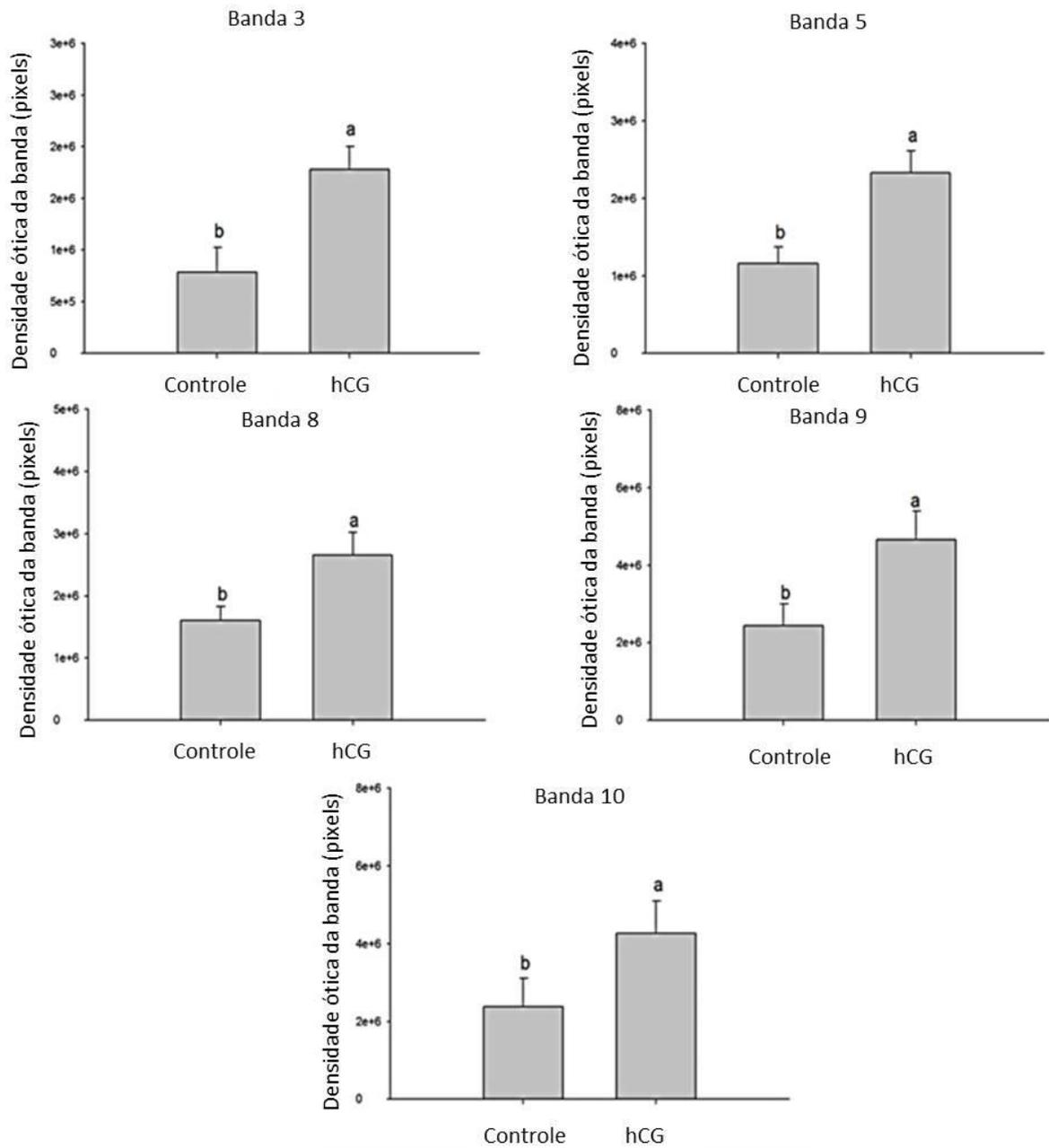
			B1, mitochondrial	atividade transportadora transmembrana.
			Tubulin alpha-1B chain-like isoform X1	
			Tubulin alpha-1C chain-like	
			Tubulin alpha-1D chain-like	
16	64,53	6 275 625	Tubulin beta chain-like isoform X1	Ligante, ligante derivado de carboidrato; atividade catalítica, atividade hidrolase; atividade molecular estrutural, componente estrutural do citoesqueleto.
			Tubulin beta chain-like, isoform X2	
			Tubulin beta-2A chain-like	
			Tubulin beta-4A chain	
			Tubulin beta-4B chain-like	
			Flotillin-1 isoform X1	Ligante proteico.
			Reggie protein 2b	Ligante proteico.
20	53,55	5 271 600	Sperm-associated antigen 6	Citoesqueleto; cromossomo; citoplasma; núcleo.
			DNA helicase MCM9	Ligante derivado de carboidrato; ligante heterocíclico; atividade catalítica, atividade de hidrolase.

A creatina quinase (CK) foi a proteína mais abundante no sêmen de ariacó. CK é uma proteína essencial na manutenção da homeostase da energia celular, usando creatina (Cr) para a transferência reversível de fosforil entre ATP e fosfocreatina (PCr) na reação $\text{MgATP} + \text{Cr} \leftrightarrow \text{MgADP} + \text{PCr}$ (SCHLATTNER et al., 2016). A motilidade em espermatozoides de peixes dura curtos períodos, provavelmente devido à quantidade de ATP, que é consumido muito mais rapidamente do que a mitocôndria pode produzi-lo (COSSON, 2007a). Por isso, a quantidade de ATP estocado parece ser importante para cobrir a alta demanda energética, assim como as enzimas que modulam este metabolismo (LI, et al., 2009). A gonadotrofina coriônica humana aumentou a expressão desta proteína no sêmen de ariacó, juntamente com *solute carrier protein family 25* (SLC25). Em trutas, o início da motilidade espermática é possivelmente modulada pelo potencial de membrana, que está diretamente ligado à regulação iônica (GATTI et al. 1990; BOITANO & OMOTO 1991).

No presente estudo, o hCG induziu a expressão da proteína SLC25, que pertence a uma família de proteínas que transportam metabólitos, nucleotídeos e cofatores pela membrana mitocondrial (FIERMONTTE et al., 2009). Baseado na análise *in silico* de interação proteína-proteína, a “*creatine kinase*” interage com outras proteínas, uma delas também presente no sêmen de ariacó, a SLC25 membro 5 (Fig. 22a), bem como com outros constituintes da membrana celular, como proteínas G, que por sua vez estão envolvidas a transdução de vários sistemas de sinalização celular.

A tubulina também está entre as proteínas mais abundantes no sêmen de ariacó. Dietrich et al. (2014 a) e Nynca et al. (2014 a) relataram a tubulina como sendo o componente mais abundante no proteoma dos espermatozoides de carpa e truta arco-íris, respectivamente. A tubulina é o maior constituinte dos micro-túbulos (FRANCOU et al., 2014).

Figura 21 - Intensidades (média±erro padrão) das proteínas do sêmen de ariacó, *L. synagris*, diferencialmente expressas nos grupos controle e tratado com hCG. Barras com superscritos diferentes são diferentes pelos testes t de Student ou Tukey ($p < 0,05$).



O presente estudo do proteoma de ariacó identificou um grande número de proteínas com função molecular de ligação, assim como as descritas por Nynca et al. (2014 a) em espermatozoides de truta arco-íris, a maioria delas ligantes de carboidratos. O tratamento hormonal com hCG aumentou a expressão de proteínas importantes no sêmen de ariacó, como PSP-I e II, HSP 90, Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L1, Transferrina, dentre outras. A principal glicoproteína seminal (PSP) é uma espermadesina encontrada em porcos, cavalos e touros (TOPFER-PETERSEN et al., 1998). As PSPs se ligam a carboidratos e potencialmente a glicoproteínas da zona pelúcida. Não há relatos sobre a presença de espermadesinas no sêmen de ariacó.

O presente estudo ainda identificou um peptídeo, com escore aceitável, similar a PSP. Yanagimachi et al. (2013) analisaram a fertilização em sete espécies de peixe e concluíram que, quando próximo à micrópila, os espermatozoides parecem mudar de rota e aproximarem-se mais ainda. Além disso, os mesmos autores sugeriram que esta atração era mediada por uma glicoproteína. De acordo com estudos prévios (JAFFE, 1990; EVANS & KOPF, 1998; SWANN & PARRINGTON, 1999), deve haver algumas proteínas na superfície do espermatozoide que se ligam à micrópila, mesmo havendo um poro para a entrada no ovócito. As interações ovócito-espermatozoide ainda não estão claramente elucidadas. AS PSP-I e II podem ter um papel na atração do espermatozoide pela micrópila, mas novas investigações devem ser conduzidas para confirmar esta hipótese em ariacós.

Enolase α também foi encontrada em sêmen de indivíduos do grupo controle, enquanto nenhuma isoforma desta proteína foi identificada nos indivíduos tratados. Force et al. (2004) sugeriram que a presença de enolase α caracteriza espermatozoides anormais e imaturos em humanos, porém a presença de enolase-S caracteriza espermatozoides normais e desenvolvidos. Quando estimuladas com gonadotrofina, as espermatogônias começam uma rápida proliferação para a meiose em enguia japonesa (OHTA et al., 2007). No presente estudo, outras proteínas expressas em indivíduos não induzidos, como *borealin* e *MAGUK p55*, reforçam a teoria de que os espermatozoides estavam ainda nas fases iniciais de desenvolvimento. A *borealin* é um componente do complexo cromossômico passageiro, um regulador importante da mitose (LIU, et al., 2014) e *MAGUK p55* está envolvida na formação das *tight junctions* (BIT-AVRAGIM et al., 2008), conexões entre as células de Sertoli e as espermatogônias. A nutrição da espermatogônias pelas células de Sertoli deve ocorrer em um microambiente isolado do sistema imunológico (SCHULZ et al. 2010) e nos tubos seminíferos essa comunicação ocorre através das *tight junctions*, que aumentam em número após a segunda divisão meiótica (BATLOUNI et al., 2009). Em peixes, os espermatozoides

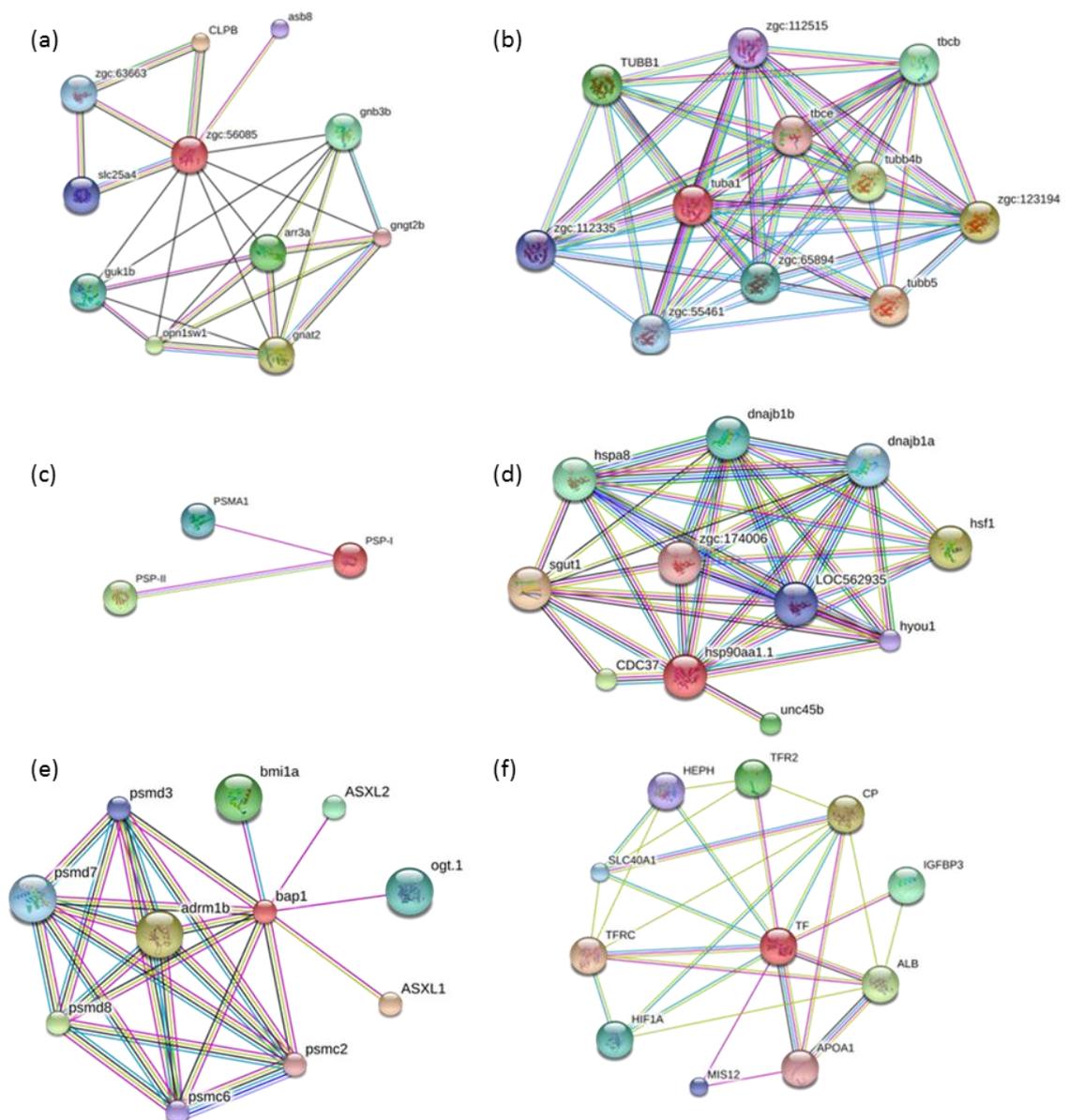
amadurecem em cistos, o que pode sugerir que no momento da coleta, sejam extrusados células nas fases iniciais da espermatogênese, isto é, espermatogônias B, espermátocitos primários e secundários. Dziewulska e Domagała (2003), analisando o desenvolvimento gonadal em salmonídeos, observaram que quanto mais avançados em maturação os cistos estivessem, maior o número de espermatozoides. No presente estudo, nem *borealin* nem *MAGUK p55* foram identificados nos animais submetidos ao tratamento hormonal, provavelmente porque o desenvolvimento dos cistos foi acelerado pela ação do hCG. A porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais também corrobora essa hipótese $57,6 \pm 3,3 \%$ e $40,3 \pm 1,65 \%$, no grupo tratado com hCG e grupo controle, respectivamente.

Muitas proteínas identificadas no sêmen de ariacó possivelmente contribuem para a proteção dos espermatozoides, incluindo Glutationa S-transferase Mu 3, Proteína de choque térmico 90 (HSP90AA1), HSP70 kDa e HSP60 kDa, Proteína cognato choque térmico 71kDa (HSC71) e transferrina. As altas taxas de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias decorrente do processo de espermatogênese produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e expõe os espermatozoides à estresse oxidativo (AITKEN & ROMAN, 2008), além de causarem distúrbios na homeostase dos espermatozoides pela peroxidação dos lipídeos, redução das enzimas que regulam o influxo de cálcio e perda de ATP (AITKEN et al., 1993) e leva a danos no DNA (AGARWAL et al. 2006; ABBASIHORMOZI et al. 2012).

Os exemplares de ariacó deste estudo tratados com hCG expressaram Glutationa S-transferase Mu 3, enquanto os não tratados (grupo controle) não apresentaram esta proteína. Glutationa S-transferase é uma enzima antioxidante que catalisa a conjugação de glutatona reduzida com elementos endógenos ou exógenos tornando-os menos tóxicos, e assim protegendo a célula (CARLETTI et al., 2008). Já foi reportado que a concentração diminuída de testosterona em ratos pode inibir a expressão testicular de enzimas antioxidantes, como glutatona peroxidase, superóxido desmutase e catalase (ZINI & SCHLEGEL, 2003; GHOSH et al. 2002). Este efeito pode ser revertido com a administração de gonadotropina exógena para elevar os níveis de testosterona intratesticular (GHOSH et al. 2002; PELTOLA et al. 1996).

A terapia hormonal com hCG aumentou a expressão de *HSP90AA1* no sêmen de ariacó. As proteínas de choque térmico (HSPs) desempenham papel fundamental tanto durante a síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas, quanto na preservação.

Figura 22 – Análises In silico da interação proteína-proteína do sêmen de ariacó tratados com hCG. (a) e (b) mais abundantes, (c), (d), (e) e (f) diferencialmente expressas. (a) creatina quinase; (b) tubulina (c) PSP-I; (d) HSP90AA1; (e) ubiquitina carboxi-terminal hidrolase 5 e (f) transferrina. As proteínas foram analisadas com STRING software. A busca foi realizada com confiança média. As cores diferentes das linhas representam os tipos de associações: (-) co-expressão; (-) experimentos; (-) co-ocorrência; (-) mineração textual; (-) banco de dados e (-) homologia.



da sobrevivência celular sob condições ambientais adversas (WU 1995; GEORGOPOULOS & WELCH 1993; NEUER ET AL. 2000; SREEDHAR & CSERMELY 2004). As HSPs são principalmente expressas como resultado de estresse ambiental. Dietrich et al. (2014 b) também identificaram HSP 90 alpha1 no plasma seminal de carpa. As HSP90 foram identificadas principalmente em espermatogônias e espermátides alongadas nos testículos de coelhos (WU et al. 2011) e no presente estudo interagem com um número de cofatores incluindo HSC 70kDa (Fig. 22d). Pei et al. (2012) demonstraram que a expressão de HSP90 aumenta nos testículos de coelhos quando submetidos à estresse térmico, além de serem especificamente encontrados nas espermátides alongadas e espermatogônias. Portanto, uma expressão elevada de HSP90 pode ter um papel de proteção na espermatogênese quando em estresse térmico.

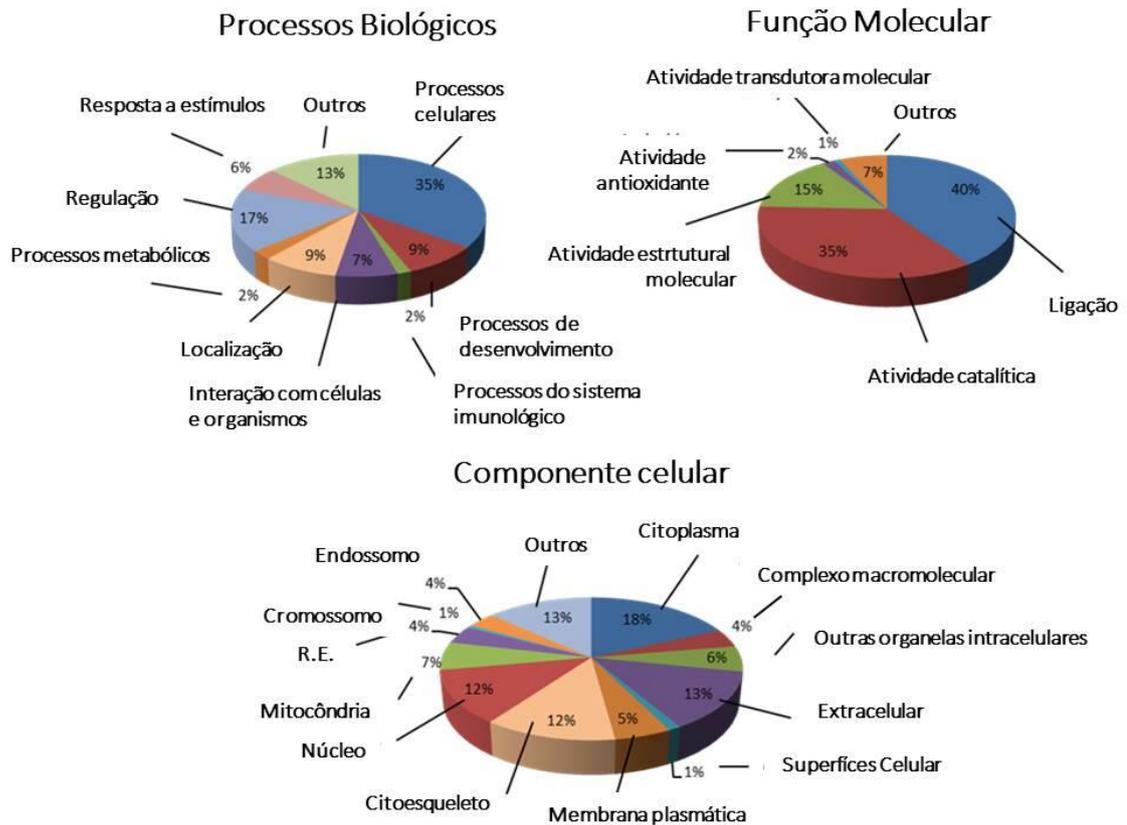
A Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase *LI* também foi mais expressa no sêmen de ariacós tratados com hCG. Esta enzima atua degradando e reciclando proteínas, removendo cadeias peptídicas pequenas ou flexíveis do C-terminal da ubiquitina (YI, et al., 2007), mantendo níveis equilibrados de monoubiquitina e assim facilitando assim sua regeneração, reciclando a ubiquitina e editando as cadeias de poliubiquitina (CHUNG & BAEK, 1999; D'ANDREA & PELLMAN, 1998). Neste estudo, a análise da rede de interação mostrou a ubiquitina carboxi-terminal hidrolase *L1* interagindo com proteassoma 26S subunidades 2, 3, 6, 7 e 8 (Figura 22e). Proteassoma 26S está implicada no processo de fertilização (MYKLES, 1998). As subunidades 6 e 7 também foram identificadas no sêmen de ariacó induzido hormonalmente, enquanto o grupo controle apresentou somente a unidade 7. A utilização do hormônio potencializou a expressão dessas subunidades, tornando o microambiente seminal mais completo.

A transferrina é uma das proteínas mais expressas no plasma seminal de carpa (WOJTCZAK et al., 2005, 2007) e protege as células contra danos oxidativos pois se liga a ferro e outros metais (DIETRICH et al., 2011). Neste estudo, as análises de interação mostram que a transferrina interage com família carreadora de soluto 40 membro 1, apolipoproteína, albumina e receptores de transferrina (Figura 22f), também presentes no sêmen de ariacó.

3.3.2.4 Ontologia gênica

As proteínas identificadas no sêmen de ariacó foram categorizadas de acordo com os processos biológicos do qual participam, sua função molecular e do componente celular do qual fazem parte (Fig. 23). A maioria das proteínas apresentaram características de ligadoras e atividade catalítica (40 e 35% respectivamente), seguidas de atividade molecular estrutural (15%), dentre outras. As proteínas ligadoras foram principalmente ligadoras de carboidratos (40,6%), seguidas de ligadoras de proteínas (23,4%), ligadoras de compostos heterocíclicos (12,5%), e ligadoras de íons (6,3%). Dentre as proteínas catalíticas, 48,3% foram hidrolases, 27,6% transferases, 6,9% as ligases, 6,9% as oxidoreduases, 6,9% peroxiredoxinas e 3,4% isomerases. Baseado nos processos biológicos, as proteínas do sêmen de ariacó estão envolvidas em processos celulares (35%) e processos de regulação (17%), dentre outros. Quanto ao componente celular do qual fazem parte, a maioria das proteínas pertencem ao citoplasma (18%), seguidas da região extracelular (13%), citosqueleto (12%) e núcleo (12%).

Figura 23 – Gráficos de pizza mostrando a ontologia gênica das proteínas do sêmen de ariacó baseado nos processos biológicos, função molecular e componente celular relativo à elas. Os dados de proteínas foram analisados usando o software STRAP (BHATIA et al., 2009). Os termos da Ontologia gênica foram obtidos dos bancos de dados UniProtKB e EBI GOA.



3.4. Conclusões

A terapia hormonal com hCG em ariacós (*L. syangris*) realizada neste estudo aumentou a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal, bem como a concentração espermática e a quantidade de proteína total do sêmen destes animais. Contudo, não foram observadas diferenças na motilidade espermática inicial, volume médio de sêmen ou integridade de DNA. O hCG influenciou positivamente a expressão de importantes proteínas no sêmen, aumentando a expressão de proteínas potencialmente envolvidas na composição celular, na estocagem de ATP e na proteção dos espermatozoides. Desta forma, os indivíduos tratados com hormônio apresentaram melhores condições para manter a quiescência dos espermatozoides, preservar a capacidade de obtenção de energia, a integridade de morfologia e consequentemente aumentar o potencial de fertilização.

A presente descrição dos parâmetros seminais e do proteoma do sêmen de ariacó permitiu o melhor entendimento dos processos fisiológicos aos quais estão submetidos os espermatozoides e o que muda, a nível molecular, quando os animais recebem um aporte hormonal. Desta maneira, é indicado o uso de hCG em ariacós cultivados como parte do pacote tecnológico que engloba os manejos desta espécie.

Este estudo foi pioneiro na detecção de proteínas seminais em ariacós, e até a publicação desta tese, a primeira em peixes marinhos nativos da costa brasileira. A disponibilidade de um catálogo de proteínas abre novas oportunidades para pesquisas que contemplem fertilização e estocagem de sêmen desta espécie que apresenta grande potencial para aquicultura.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação das características fisiológicas reprodutivas, bem como a determinação das proteínas do sêmen de ariacó possibilitam o desenvolvimento de pacotes tecnológicos voltados à produção desta espécie.

Os estudos produzidos por esta tese revelam que o uso de gonadotrofina coriônica humana melhora as condições fisiológicas do sêmen de ariacó produzidos em cativeiro, aumentando a qualidade dos espermatozoides e a chance de fecundação. Os resultados obtidos aqui podem ser largamente utilizados para efeito de comparação entre estudos correlatos, pois a dose hormonal utilizada segue um padrão já estabelecido por outros autores e assim contribui grandemente para a padronização dos métodos de avaliação da qualidade reprodutiva em peixes. Este trabalho favorece a compreensão do funcionamento do metabolismo seminal e abre caminho para novos *insights* na pesquisa de reprodução animal. Contudo, é necessário ainda que sejam desenvolvidas pesquisas subsequentes para a determinação dos proteoma da membrana plasmática dos espermatozoides e proteínas do plasma seminal, bem como determinar o mapa proteico em duas dimensões. Também é relevante a condução de testes de doses inseminantes e taxas de fertilização.

É também oportuno pontuar que o estabelecimento do mercado de piscicultura marinha depende de recursos humanos especializados e treinados para atuar na área. Deve-se ainda assegurar meios financeiros, celebrando parcerias entre a iniciativa privada, o governo federal, as Secretarias Estaduais de Pesca e Aquicultura (SPA), as Universidades Estaduais e Federais e demais instituições de forma continuada, visando, sobretudo, a massificação da produção ariacó.

REFERÊNCIAS

- ABBASIHORMOZI, S., SHAHVERDI, A., KOUHKAN, A., CHERAGHI, J., AKHLAGHI, A.A., KHEIMEH, A., Relationship of leptin administration with production of reactive oxygen species, sperm DNA fragmentation, sperm parameters and hormone profile in the adult rat. *Arch. Gynecol. Obstet.* 287, 1241–1249. doi:10.1007/s00404-012-2675-x, 2013.
- ABDO-DE LA PARRA, M. I.; RODRÍGUEZ-IBARRA, L. E.; CAMPILLO-MARTÍNEZ, F.; VELASCO-BLANCO, G.; GARCÍA-AGUILAR, N.N.; ÁLVAREZ-LAJONCHÈRE, L. S.; VOLTOLINA, D. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(1): 141-146, 2010.
- AFZELIUS, B. A., Fine Structure of the Garfish Spermatozoon, *Journal Of Ultrastructure Research*, v.64, p.309-314, 1978.
- AGARWAL, A., GUPTA, S., SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 18, 325–332. doi:10.1097/01.gco.0000193003.58158.4e, 2006.
- AGUIAR, P.H.P., ABREU, J.J., COSTA, M.E.L.T. et al. Coleta e avaliação de sêmen canino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.46, n.5, p.537-544, out. 1994.

AGUIAR, P.H.P., ANDRADE, V.J., ABREU, J.J. et al. Aspectos físicos e morfológicos e pH do sêmen de reprodutores bubalinos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.48, n.3, p.325-331, jun. 1996.

AITKEN, R.J., HARKISS, D., BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. J. Reprod. Fertil. 98, 257–265. doi:10.1530/jrf.0.0980257, 1993.

AITKEN, R.J., ROMAN, S.D., Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Adv. Exp. Med. Biol. 636, 154–171. doi:10.4161/oxim.1.1.6843, 2008.

ALAVI, S.M.H, COSSON, J.J., COWARD, K., RAFIEE, G., Fish Spermatology, Alpha Science International LTDA., Oxford, UK, 2007

ALAVI, S.M.H, RODINA, M., VIVEIROS, A. T.M., COSSON, J., GELA, D., BORYSHPOLETS, S., LINHART, O., Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.), Theriogenology, v.72, p.32–43, 2009.

ALEGRIA, J. R. C. & MENEZES, M. F. Edad y crecimiento del ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), em el Nordeste del Brasil. Arquivo de Ciências do Mar, v. 10, n. 1, p. 65-68, 1970.

ALLEN, G. R. Snappers of the world: an annotated and illustrated catalogue of lutjanid species know to date. FAO Fish Synopsis, v.6, n.125, p.1-280, 1985.

ARNOLD, C. R., J. M. WAKEMAN, T. D. WILLIAMS, AND G. D. TREECE. 1978.

Spawning of red snapper (*Lutjanus campechanus*) in captivity. *Aquaculture* 15:301-302.

AQUINO-CORTEZ, A.I., DANIEL MACHADO DA SILVA AIRTON ALENCAR DE

ARAÚJO, L.I., 2016. Proteins of the canine seminal plasm. *Ciência Rural* 46:46, 901–908.

doi:10.1590/0103-8478cr20150972

BAKER, M.A., HETHERINGTON, L., REEVES, G., MÜLLER, J., AITKEN, R.J., The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics* 8, 2312–2321. doi:10.1002/pmic.200700876, 2008.

Proteomics 8, 2312–2321. doi:10.1002/pmic.200700876, 2008.

BARTH, A. D. & OKO, R.J., Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, Iowa

State University Press, 285 p., 1989, Disponível em

http://books.google.com.br/books?printsec=frontcover&vid=LCCN89001770&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Acesso em fevereiro de 2012.

BASTADO , H., GUEDEZ, C., LEÓN, M., Características del semen de trucha arco-iris de

diferentes edades, bajo condiciones de cultivo em Mérida, Venezuel, *Zootecnia Tropical*,

v.22, n.3, p.277-288, 2004.

BATLOUNI, S.R., NÓBREGA, R.H., FRANÇA, L.R., Cell junctions in fish seminiferous

epithelium. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 207–217. doi:10.1007/s10695-008-9253-y,

BHATIA, V.N., PERLMAN, D.H., COSTELLO, C.E., MCCOMB, M.E., Software tool for researching annotations of proteins: Open-source protein annotation software with data visualization. *Anal. Chem.* 81, 9819–9823. doi:10.1021/ac901335x, 2009.

BILLARD, R., Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species, *Reprod. Nutr. Develop.*, v.26, p.877–920, 1986.

BILLARD, R., Endocrinology and fish culture, *Fish Physiol. Biochem.*, v.7, p. 49–58, 1989.

BILLARD, R.; COSSON, M. P., Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal Experimental Zoology*, v.261, p.122- 131, 1992.

BILLARD, R., COSSON, J. & CRIM, L. W., Motility and survival of halibut sperm during short term storage. *Aquatic Living Resources*, v.6, p.67–75, 1993.

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W.; SUQUET, M., 1995: Sperm physiology and quality. In: N. R. BROMAGE, R. J. ROBERTS, *Broodstock management and egg and larval quality*. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25–52.

BILLARD R. J.; COSSON, S. B.; NOVEIRI M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review, *Aquaculture*, v.236, p.1-9, 2004.

BIT-AVRAGIM, N., ROHR, S., RUDOLPH, F., VAN DER VEN, P., FÜRST, D., EICHHORST, J., WIESNER, B., ABDELILAH-SEYFRIED, S., Nuclear localization of the

zebrafish tight junction protein nagie oko. Dev. Dyn. 237, 83–90. doi:10.1002/dvdy.21389, 2008.

BJOÈRNDAHL, L., SOÈDERLUND, I., KVIST, U., Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment, Human Reproduction Vol.18, No.4 pp. 813±816, 2003

BLOM, E., The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification of bull spermogram. Nord. Vet. Med., v.25(7-8), p.383-91, 1973.

BOITANO, S., OMOTO, C.K., Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. J. Cell Sci. 98 (Pt 3), 343–349. 1991.

BOMBARDELLI, R.A., MÖRSCHBÄCHER, E.F., CAMPAGNOLO, R., SANCHES, E.A., SYPERRECK, M.A., Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). Rev. Bras. Zootec. 35, 1251–1257. doi:10.1590/S1516-35982006000500001, 2006.

BORGES, A., SIQUEIRA, D.R., JURINITZ, D.F., Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). Fish Physiology and Biochemistry, v.31, p. 45-53, 2005.

BOURQUE, B.D., PHELPS, R.P., 2007. Induced spawning and egg quality evaluation of red snapper, *Lutjanus campechanus*. J. World Aquac. Soc. 38, 208–217. doi:10.1111/j.1749-7345.2007.00090.x

BOZA-ABARCA, J., CALVOS-VARGAS, E., SOLIS-ORTIZ, N., KOMEN, J., 2008.

Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the Marine Biology Station, Puntarenas, Costa Rica. *Ciencias Mar.* 34, 239–252.

BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3, 1976.

CABRERA, J.R., BARRIOS, T.C., QUIJADA, J.M., Inducción al desove del pargo del mangle, *Lutjanus grius* Linnaeus (Pisces: Lutjanidae), sexualmente maduro en cautiverio, *Arquivo de Ciências do Mar*, 31, (1-2): 57-63. 1998.

CABRITA, E., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., GAVAIA, P.J., RIESCO, M.F., VALCARCE, D.G., SARASQUETE, C., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.034

CAMPBELL, P.M., T.G. POTFINGER, J.P. SUMPTER, Stress Reduces the Quality of Gametes Produced by Rainbow Trout, *Biology Of Reproduction*, v.47, p.1140-1150, 1992.

CAMPOS, V.T.P., Inducción a la ovulación y espermiogénesis en el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) y almacenamiento de su semen. Tese de Mestrado (Maestro en Ciencias con Especialidad en Manejo de Recursos Marinos). Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Bolivia, 2006.

CARLETTI, E., SULPIZIO, M., BUCCIARELLI, T., DEL BOCCIO, P., FEDERICI, L., DI ILIO, C., Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquat.Toxicol.* 90, 48–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.015>, 2008.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologia de produção e armazenamento de sêmen de peixes, *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361- 366, 2007.

CARNEIRO P. C. F.; SEGUI M. S.; IÓRIS-FILHO C. R.; MIKOS J. D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. *Revista Acadêmica*, v.4, n.3, 2006.

CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v. 63, p. 472-489. 2003.

CASTILLO-VARGASMACHUCA, S., PONCE-PALAFOX, J.T., GARCÍA-ULLOA, M., ARREDONDO-FIGUEROA, J.L., RUIZ-LUNA, A., CHÁVEZ, E.A., TACON, A.G., 2012. Effect of stocking density on growth performance and yield of subadult pacific red snapper cultured in floating sea cages. *N. Am. J. Aquac.* 74, 413–418. doi:10.1080/15222055.2012.676002

CASTILLO-VARGASMACHUCA, S.G., PONCE-PALAFOX, J.T., ARÁMBUL-MUÑOZ, E., RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, G., ARAGÓN-NORIEGA, E.A., 2018. The spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus* Steindachner 1869) farmed in marine cages : review of growth models. *Rev. Aquac.* 10, 376–384. doi:10.1111/raq.12166

- CASSINELLO, J., ABAIGAR, T., GOMENDIO, M. et al. Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mhorh*, *G. dorcas neglecta* and *G. cuvieri*). *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.113, n.1, p.35-45, may. 1998.
- CAYLORA, R.E., P.M. BIESIOT, J.S. FRANKS, Culture of cobia (*Rachycentron canadum*): cryopreservation of sperm and induced spawning, *Aquaculture*, v.125(1-2), p. 81-92, 1994.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal, 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.
- CHACÓN, J.,: Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. *Rep. Dom. Anim.* v.36, p.91, 2001.
- CHAO, N.H., TSAI, H.P., LIAO, I.C., Short and long term Cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Block and Schneider), *Asian Fisheries Science*, v.5, p.103-116, 1992.
- CHOI, J., SMITZ, J., 2014. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. *Mol. Cell. Endocrinol.* 383, 203–213. doi:10.1016/j.mce.2013.12.009
- CHOU, R., H. B. LEE, AND H. S. LIM. 1995. Fish farming in Singapore: A review of seabass (*Lates calcarifer*), mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*), and sub-nose pompano (*Trachinotus blochii*). In: *Culture of High-Value Marine Fishes in Asia and the United States*. Main, K. L. and C. Rosenfeld, Editors. The Oceanic Institute. Pages 57-65.

CHUNG, C.H., BAEK, S.H., Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 633–640. doi:10.1006/bbrc.1999.1880, 1999.

CIERESZKO, A., DIETRICH, M.A., NYNCA, J., Fish semen proteomics - New opportunities in fish reproductive research. *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.005, 2015.

CLARO, R. Ecología y ciclo de vida de la biajaiba, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), en la plataforma cubana. II - biología pesquera, *Rep. Invest. Inst. Oceanol.*, v.177, p.1-53, 1981a.

CLARO, R. Ecología y ciclo de vida de la biajaiba, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), en la plataforma cubana. III - nutrición, *Ciências Biológicas.*, v.6, p.93-110, 1981b.

CLARO, R. Ecología y ciclo de vida de la biajaiba, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), en la plataforma cubana. IV – reproducción. *Rep. Invest. Inst. Oceanol.*, v 5, p.1-37. 1982.

COLOMBO, G., GRANDI, G., ROMEO, A., GIOVANNINI, G., PELIZZOLA, D., CATOZZI, L., PIFFANELLI, A., Testis cytological structure, plasma sex steroids, and gonad cytosol free steroid receptors of heterologous gonadotropin (hCG)-stimulated silver eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 65, 167–178. doi:10.1016/0016-6480(87)90162-6, 1987.

CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca) (2013) Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2013. SAGARPA, Mexico City.

COSSON, J, et al., Moviments of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analyses. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, v.44, p.103, 113, 1997.

COSSON, J., DREANNO, C., BILLARD, R., SUQUET, M. and CIBERT, C., 1999.

Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In GAGNON, C. (org.). *The male gamete: From basic science to clinical applications*. Cache River Pres, 516 p. 1999.

COSSON, J., The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa, *Aquaculture International*, v.12, p.69–85, 2004.

COSSON, J. Methods to analyse the movements of fish spermatozoa and their flagella, in: Alavi, S. M. H., Cosson, J. J., Coward, K. & Rafiee, G., *Fish Spermatology*, pp. 63–102. 2007a.

COSSON, J., The motility apparatus of fish spermatozoa. In ALAVI, S. M. H., 2007b.

COSSON, J., Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence, *Journal of Fish Biology*, v.76, p.240–279, 2010.

D'ANDREA A, PELLMAN D., Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 33, 337–352. 1998.

DEGRAAF, J.D., D.L. BERLINSKY, Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock, (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa, *Aquaculture*, v.234, p. 527–540, 2004.

DIETRICH, M., DIETRICH, G., HLIWA, P., CIERESZKO, A., Carp transferrin can protect spermatozoa against toxic effects of cadmium ions. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 153 (2011) 422–429. doi:10.1016/j.cbpc.2011.02.003, 2011.

DIETRICH, M.A., ARNOLD, G.J., FRÖHLICH, T., CIERESZKO, A., In-depth proteomic analysis of carp (*Cyprinus carpio L*) spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics* 12, 10–15. doi:10.1016/j.cbd.2014.09.003, 2014 a

DIETRICH, M.A., ARNOLD, G.J., NYNCA, J., FRÖHLICH, T., OTTE, K., CIERESZKO, A., Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma. *J. Proteomics* 98, 218–232. doi:10.1016/j.jprot.2014.01.005, 2014 b.

DUMAS, S., ROSALES-VELÁZQUEZ, M.O., CONTRERAS-OLGUÍN, M., HERNÁNDEZ-CEBALLOS, D., SILVERBERG, N, Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Aquaculture* 234, 615–623. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.11.022, 2004.

DZIEWULSKA, K., AND DOMAGAŁA, J., 2003, Histology of salmonid testes during maturation, *Reproductive Biology*, v. 3, n. 1.

EMATA, A.; EULLARAM, B.; BAGARINAO, T., Induced spawning and early life history description of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*, v.121, p.381-387, 1994.

EMATA, A. C., Breeding and Seed Production of the Mangrove Red Snapper, *Aquaculture Asia*, v. VII, n.3, 2002.

EMATA, A.C., Reproductive performance in induced and spontaneous spawning of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*: a potential candidate species for sustainable aquaculture 849–857. 2003.

EMATA, A.C., BORLONGAN, I.G., 2003. A practical broodstock diet for the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture* 225, 83–88. doi:10.1016/S0044-8486(03)00279-5

EMATA, A.C., OGATA, H.Y., GARIBAY, E.S., FURUITA, H., 2003. Advanced broodstock diets for the mangrove red snapper and a potential importance of arachidonic acid in eggs and fry. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 489–491. doi:10.1023/B:FISH.0000030637.26086.ab

ESTUDILLO, C.B., DURAY, M.N., MARASIGAN, E.T., EMATA, A.C., 2000. Salinity tolerance of larvae of the mangrove snapper. *Aquaculture* 190, 155–167.

EVANS, J.P., KOPF, G.S. Molecular mechanisms of sperm-egg interactions and egg activation. *Andrologia* 30, 297–307. doi:10.1111/j.1439-0272.1998.tb01174.x, 1998.

FAO, The State Of World Fisheries And Aquaculture 2012, Rome, 176p., 2012.

FAO, THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE 2010-2011, Rome, 148p., 2011.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Meeting The Sustainable Development Goals. Rome. 210 pp.

FAO, The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic, Volume 3: Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals. Edited by Kent E. Carpenter Department of Biological Sciences, Old Dominion University, Norfolk, Virginia, USA, ISBN 92-5-104827-4, 2002

FAUVEL et al., Characteristics of sperm of captive seabass (*Dicentrarchus labrax*) in relation to its fertilization potential, Journal of Fish Biology, v.54, p.356-369, 1999.

FERNANDEZ, J.L., MURIEL, L., RIVERO, M.T., GOYANES, V., VAZQUEZ, R., ALVAREZ, J.G. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. J. Androl. 24, 59–66. doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x, 2003.

FIERMONTE, G., PARADIES, E., TODISCO, S., MAROBBIO, C.M.T., PALMIERI, F., 2009. A novel member of Solute Carrier Family 25 (SLC25A42) is a transporter of coenzyme A and adenosine 3,5-diphosphate in human mitochondria. J. Biol. Chem. 284, 18152–18159. doi:10.1074/jbc.M109.014118

FONTELES-FILHO, A. A. Oceanografia, Biologia e Dinâmica Populacional de Recursos Pesqueiros. Fortaleza, Expressão Gráfica e Editora, 464p. 2011

FORCE, A., VIALARD, J.-L., SAEZ, F., GRIZARD, G., BOUCHER, D., 2004.

Electrophoretic characterization of the human sperm-specific enolase at different stages of maturation. *J. Androl.* 25, 824–9. doi:25/5/824 [pii]

FRANCISCATTO, R. et al. Qualidade do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* e taxa de fertilidade após o resfriamento. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* v. 26, p. 213-215, 2002

FRANCOU, M.M., TEN, J., BERNABEU, R., DE JUAN, J., 2014. Capacitation and acrosome reaction changes α -tubulin immunodistribution in human spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online* 28, 246–250. doi:10.1016/j.rbmo.2013.10.001

GAGE et al., Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon, *Journal of Fish Biology*, v.61, p.1528–1539, 2002.

GAITÁN-ESPITIA, J.D., MARTÍNEZ-SILVA, M.A., BORRERO, C.E., RAMÍREZ, L., VALENCIA, J.P. Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): Testing the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. *Aquaculture* 384–387, 6–12. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.12.002, 2013.

GALO, JM., STREIT-JUNIOR, DP., SIROL, RN., RIBEIRO, RP., DIGMAYER, M., ANDRADE, VXL. E EBERT, AR. 2011, Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon*

orbignyana (Valenciennes, 1849) after cryopreservation, Braz. J. Biol., vol. 71, no. 3, p. 693-699.

GATTI JL, BILLARD R, CHRISTEN R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, spermatozoa: role in the initiation of sperm motility. J Cell Physiol 143:546–554. doi:10.1002/jcp.1041430320, 1990.

GALVANI, F., COSTA, E.P., TORRES, C.A.A. et al. Perímetro escrotal, características físicas do sêmen e morfopológicas dos espermatozoides de touros Nelore de alta libido comparados com animais de libidos inferiores. Ars Veterinária, Jaboticabal, v.16, n.2, p.97-103, ago. 2000.

GEORGOPOULOS, C., WELCH, W.J., Role of the Major Heat Shock Proteins as Molecular Chaperones. Annu. Rev. Cell Biol. 9, 601–634. doi:10.1146/annurev.cb.09.110193.003125, 1993.

GESTEIRA, T.C.V e ROCHA, C.A.S.. 1976. Estudo sobre a fecundidade do ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), da costa do estado do Ceará (Brasil). Arquivo de Ciências do Mar, 16(1): 19-22.

GHOSH D, DAS UB, GHOSH S, MALLICK, M, DEBNATH, J, 2002. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: A correlative study with testicular oxidative stress. Drug Chem Toxicol; 25:281-92.

GINZBURG, A.S. 1972. In ALAVI, S. M. H., COSSON, J. J., COWARD, K. & RAFIEE, G., Fish Spermatology, cap. 9, pp. 281–316. Oxford: Alpha Science, 2007.

GODINHO, H. P, Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.3, p.351-360, 2007.

GROISON, et al., Some characteristics of sperm motility in European hake (*Merluccius merluccius*, L., 1758), *J. Appl. Ichthyol.*, v.26, p.682–689, 2010, a.

GROISON et al., Sperm motility in European hake, *Merluccius merluccius*, and characterization of its spermatozoa concentration and volume, spermatocrit, osmolality and pH, *Aquaculture* v.301, p.31–36, 2010, b.

GUZMÁN, J.M., RAMOS, J., MYLONAS, C.C., MAÑANÓS, E.L., Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture* 316, 121–128. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.03.014, 2011.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. (ed). *Reproduction in farm animals*. 7. ed. Philadelphia: Lippicott Williams and Wickins, 509p., 2000.

HASTEY, R.P., PHELPS, R.P., DAVIS, D.A., CUMMINS, K.A., 2010. Changes in free amino acid profile of red snapper *Lutjanus campechanus*, eggs, and developing larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 473–481. doi:10.1007/s10695-009-9317-7

HERNÁNDEZ, C., IBARRA-CASTRO, L., HERNÁNDEZ, C.H., QUINTERO-MARTÍNEZ, G., ARAGÓN-NORIEGA, E.A., TACON, A.G., 2015. Growth performance of

spotted rose snapper in floating cages and continuous water-flow tank systems. N. Am. J. Aquac. 77, 423–428. doi:10.1080/15222055.2015.1032458

HOLT, W.V., Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences, Theriogenology, v.53, p.47-58, 2000.

HONG WAN-SHU, ZHANG QI-YONG, Artificial Propagation And Breeding Of Marine Fish In China, Chinese Journal of Oceanology and Limnology, v.20(1), p.41-51, 2002.

IBAMA, Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação, Brasília, 174 p., 2008.

IBARRA-CASTRO, L. N.J. DUNCAN , GnRH α -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*, Aquaculture, v.272, p.737–746, 2007.

IBARRA-CASTRO, L. AND L. ALVAREZ-LAJONCHERE, Improved Induced-Spawning Protocol for the Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*), The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh v.61(2), p.121-133, 2009.

INABA, K., DREANNO, C. & COSSON, J., Control of sperm motility by CO₂ and carbonic anhydrase in flatfish. Cell Motility and the Cytoskeleton, v.55, p.174–187, 2003.

JACKSON, L.F., SULLIVAN, C.V., Reproduction of white perch: the annual gametogenic cycle. Trans. Am. Fish. Soc. v.124, p.563–577, 1995.

JAFFE, L.A., First messengers at fertilization. J. Reprod. Fertil. Suppl. 42, 107–16. 1990.

JAMIESON, B. G. M., Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa.

Cambridge: Cambridge University Press, 319 p., 1991.

KAVAMOTO, E.T., MAINARDES-PINTO, C.S.R., ANDDRAGE-TALMELLI, E.F.,

Produção espermiática do curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Boletim do Instituto de Pesca, v.24, p.73-78, 1997.

KAVAMOTO, E.T., BARNABE, V.H., CAMPOS, B.E.S. & ANDRADE, E.F.T.

Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do Curimbatá, *Prochilodus scrofa*

(Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). B. Inst. Pesca 25, 61–6, 1999.

KIME, D.E., 1998. Endocrine Disruption in Fish. Kluwer, Dordrecht. In Kime et al.,

Computer-assisted sperm analysis CASA as a tool for monitoring sperm quality in fish,

Comparative Biochemistry and Physiology , v.130, p.425-433, 2001.

KLIPPEL, S. & PERES, M.B. Resultados da avaliação de estoques das dez principais

espécies na pesca de linha de mão da costa central do Brasil. Programa REVIZEE, Relatório

Técnico, 60 p., Rio Grande, 2002.

KOVÁCS, G. Tecnologia da criopreservação do sêmen de peixes. Ministério da Agricultura.

Departamento Nacional de Obras contra as Secas – DNOCS/AGROBER. Fortaleza. 1990.

KRASZNAI, Z, MORISAWA, M., KRASZNAI, Z. T., MORISAWA, S., INABA, K., BAZSANE, Z. K., RUBOVSKY, B., BODNAR, B., BORSOS, A. & MARIAN, T., Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 55, 232–243, 2003.

KROODSMA DA, MAYORGA J, HOCHBERG T, MILLER NA, BOERDER K, FERRETTI F, WILSON A, BERGMAN B, WHITE TD, BLOCK BA, WOODS P, SULLIVAN B, COSTELLO C, WORM B (2018) Tracking the global footprint of fisheries. *Science* 359:6378, 904-908.

LAFLEUR, G.J., THOMAS, P., Evidence for a role of Na⁺K⁺-ATPase in the hydration of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation, *J. Exp. Zool.*, v.258, p.126–136, 1991.

LE, M.H., HOA, V.T., 2017. Effect of cations on sperm motility of mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus* 5, 10–14.

LEONARDO, A. F. G.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I.; BATLOUNI, S. R. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture* [Amsterdam], v. 240, n. 1-4, p. 451-461, 2004.

LEVAVI-SIVAN, B.; VAIMAN, R.; SACHS, O.; TZCHORI, I. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* [Amsterdam], v. 229, n. 1-4, p. 419-431, 2004.

LEU, M. Y.; CHOU, Y. H. Induced spawning and larval rearing of captive yellowfin porgy, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn). *Aquaculture* [Amsterdam], v. 143, n. 2, p. 155-166, 1996.

LI, P., HULAK, Æ.M., LINHART, Æ.O., Sperm proteins in teleostean and chondrosteian (sturgeon) fishes 567–581. doi:10.1007/s10695-008-9261-y, 2009.

LIAO, I. C., M. SU, e S. CHANG. 1995. A review of the nursery and growout techniques of high- value marine finfishes in Taiwan. In: *Culture of High-Value Marine Fishes in Asia and the United States*. Main, K. L. and C. Rosenfeld, Editors. The Oceanic Institute. Pages 121-137.

LIM, L. C., L. CHEONG, H. B. LEE, AND H. H. HENG. 1985. Induced breeding studies of the John's snapper *Lutjanus johni* (Bloch), in Singapore. *Singapore Journal of Private Industries* 13:70-83.

LIMA, W.B., Idade e crescimento do ariacó, *Lutjannus synagris*, Linnaeus, 1758 (Teleostei: Lutjanidae) da costa norte da Bahia-Brasil. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, 40p., Vitória, 2004.

LINHART, O., SLECHTA, V. e SLAVIK, T., Fish sperm composition and biochemistry, *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica*, v.16, p.285-311, 1991.

LINHART, O., KUDO, S., Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization, *J. Fish Biol.*, v.51, p.573–582, 1997.

LIU, X., SONG, Z., HUO, Y., ZHANG, J., ZHU, T., WANG, J., ZHAO, X., AIKHIONBARE, F., ZHANG, J., DUAN, H., WU, J., DOU, Z., SHI, Y., YAO, X., Chromatin protein HP1 α interacts with the mitotic regulator borealin protein and specifies the centromere localization of the chromosomal passenger complex. *J. Biol. Chem.* 289, 20638–20649. doi:10.1074/jbc.M114.572842, 2014.

LORENZEN, K., LEBER, K.M., BLANKENSHIP, H.L., 2010. Responsible Approach to Marine Stock Enhancement: An Update. *Rev. Fish. Sci.* 18, 189–210. doi:10.1080/10641262.2010.491564

MALISON, J.A., PROCARIONE, L.S., BARRY, T.P., KAPUSCINSKI, A.R., KAYES, T.B., Endocrine and gonadal changes during the annual reproductive cycle of the freshwater teleost, *Stizostedion vitreum*. *Fish Physiol. Biochem.*, v.13, p.473–484, 1994.

MANN T., Experimental approach to the study of semen and male reproductive function. *Int J Fertil*, v.23, p.133-137, 1978.

MARIA, A.N., Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon obrigyanus*). Dissertação de Mestrado. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 71p. – Universidade Federal de Lavras, 2005

MARIA, A.N., AZEVEDO, H.C., SANTOS, J.P., CARNEIRO, P.C.F., Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote* 20, 39–43. doi:10.1017/S0967199410000559, 2012.

MARTINS, J.A.M., SOUZA, C.E.A., SILVA, F.D.A., CADAVID, V.G., NOGUEIRA, F.C., DOMONT, G.B., DE OLIVEIRA, J.T.A., MOURA, A.A., Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. *Small Rumin. Res.* 113, 115–127.

doi:10.1016/j.smallrumres.2013.01.005, 2013.

MARTÍNEZ-HEREDIA, J., ESTANYOL, J.M., BALLESCÀ, J.L., OLIVA, R., Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics* 6, 4356–4369.

doi:10.1002/pmic.200600094, 2006.

MATSUYAMA, M.; MORITA, S.; NASU, T.; KASHIWAGI, M. Daily spawning and development of sensitivity to gonadotropin and maturation-inducing steroid in the oocytes of the bamboolief wrasse, *Pseudolabrus japonicus*. *Environmental Biology of Fishes*,

[Dordrecht], v. 52, p. 281-290, 1998.

MENEZES, N.A. & FIGUEREDO, J.L., Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil.

IV. Teleostei (3), Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 96p., São Paulo, 1980.

MILIORINI, B., DAVID, L., MURGAS, S., ROSA, P.V., OBERLENDER, G., A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquac. Res.* 177–187. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02575.x, 2011.

MINTON, R. V., J. P. HAWKE, AND W. M. TATUM. 1983 Hormone induced spawning of red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Aquaculture* 30:363-368.

MIURA, T., YAMAUCHI, K., NAGAHAMA, Y., TAKAHASHI, H., Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zool. Sci.* 8, 6373. 1991.

MORAES, G.V., STREIT-JR, D.P., RIBEIRO, R.P., SAKAGUTI, E.S., SOUZA, E.D. & POVH, J.A. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozóides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). *B. Inst. Pesca* 30,109–16. 2004.

MORISAWA, M., Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* 2, 605–615, 1985.

MOURA, A.A., Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A Proteomic Approach. *J. Androl.* 27, 201–211. doi:10.2164/jandrol.05089, 2006.

MPA – MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil 2008-2009, Brasília, 100p., 2010.

MUNRO, A.D., SCOTT, A.P. AND LAM, T.J., Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 254 pp., 1990

MURGAS, L. D. S. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.3, p. 526-531, 2007.

MYLONAS, C.C., FOSTIER, A., ZANUY, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516–534.

doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.007

MYERS, R., A. & WORM, B., Rapid worldwide depletion of predatory fish communities, *Nature*, v.423, p.280-283, 2003.

MYKLES, D.L., Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems. *Int. Rev. Cytol.* 184, 157–289. 1998.

MYLONAS, C.C., SCOTT, A.P., VERMEIRSEN, E.L.M., ZOHAR, Y., Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems. *Biol. Reprod.*, v.57, p.669–675, 1997.

MYLONAS, C.C., WOODS III, L.C., THOMAS, P., SCHULZ, R.W., ZOHAR, Y., Hormone profiles of captive striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation, and longterm enhancement of milt production, *J. World Aquat. Soc.*, v. 29, p.379–392, 1998.

MYLONAS, C.C., PAPADAKI, M., DIVANACH, P., Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquat. Res.*, v.34, p.1161–1170, 2003.

NATIONAL MARINE FISHERIES SERVICE OFFICE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, Fisheries of The United States 2009 and 2010, Disponível na internet via <<http://www.sr.nmfs.noaa.gov/st1>>. Acessado em janeiro/2011.

NEAR, T.J., EYTAN, R.I., DORNBURG, A., KUHN, K.L., MOORE, J.A., DAVIS, M.P., AINWRIGHT, P.C., FRIEDMAN, M., SMITH, W.L., Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 13698–13703. 2012.

NELSON, J.S. (2006) *Fishes of the World*. 4th edition. John Willey and Sons Inc., New York, 601 pp.

NEUER, A., SPANDORFER, S.D., GIRALDO, P., DIETERLE, S., ROSENWAKS, Z., WITKIN, S.S., The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum. Reprod. Update* 6, 149–59. 2000.

NMFS. 2002. *United States Domestic Commercial Fishery Landings: 1950-2000*. Available from: National Marine Fisheries Service, Fisheries Statistics and Economics Division, Silver Spring, Maryland. [Http://www.st.nmfs.gov/](http://www.st.nmfs.gov/). Accessed 2002 March 1.

NYNCA, J., ARNOLD, G.J., FRÖHLICH, T., OTTE, K., CIERESZKO, A., Proteomic identification of rainbow trout sperm proteins. *Proteomics* 14, 1569–1573.

doi:10.1002/pmic.201300521, 2014a

NYNCA, J., ARNOLD, G.J., OTTE, K., FLENKENTHALER, F., CIERESZKO, A.,

Proteomic identification of rainbow trout seminal plasma proteins, 133–140.

doi:10.1002/pmic.201300267, 2014b

OHTA, T., MIYAKE, H., MIURA, C., KAMEI, H., AIDA, K., MIURA, T., Follicle-

Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in

Japanese Eel, *Anguilla japonica*1. *Biol. Reprod.* 77, 970–977.

doi:10.1095/biolreprod.107.062299, 2007.

OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga

Brycon nattereri. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.1509-1515,

2007.

OSTRENSKY, A., BORGUETTI, J R., SOTO, D., *Aquicultura no Brasil, o desafio é crescer,*

Brasília, 276p., 2008.

OTTOLENGHI, F., SILVESTRI, C., GIORDANO, P., LOVATELLI, A., NEW, M.B.,

Capture-based Aquaculture: The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. *Food and*

Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2004.

PADHI, B.K.; MANDAL, R.K. 2000. *Applied fish genetics*. Fishing Chimes In: YASUI, G.

S. Variação temporal da motilidade espermática da tilápia do nilo em amostras refrigeradas e

ativadas. *Dissertação (Mestrado em Produção animal) Centro de Ciências e Tecnologias*

Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes– RJ –

2007.

PAPANIKOS, N., PHELPS, R.P., WILLIAMS, K., FERRY, A., MAUS, D., 2003. Egg and larval quality of natural and induced spawns of red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 487–488. doi:10.1023/B:FISH.0000030636.08228.4e

PASSOS-NETO, O.P., Avaliação da desova induzida hormonalmente e qualidade dos ovos de ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758), Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Instituto de Ciências do Mar. Universidade federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2010.

PEDDINTI, D., NANDURI, B., KAYA, A., FEUGANG, J.M., BURGESS, S.C., MEMILI, E., Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst. Biol.* 2, 19. doi:10.1186/1752-0509-2-19, 2008.

PEI, Y., WU, Y., QIN, Y., Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis. *Cell Stress Chaperones* 17, 81–87. doi:10.1007/s12192-011-0287-1, 2012.

PELTOLA V, HUHTANIEMI I, METSA-KETELA T, AHOTUPA, M., 1996, Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology*; 137:105-12

PETER, R.E., LIN, H.R., VAN DER KRAAK, G. AND LITTLE, M., Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. In: MUIR, J.F. AND ROBERTS, R.J. (eds.), *Recent Advances in Aquaculture*. Vol. IV. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 25–30, 1993.

PETERSSON, J., JÄRVI, T., 'False orgasm' in female brown trout: trick or treat? *Anim. Behav.*, v.61, p.497–501, 2001.

PHELPS, R.P., PAPANIKOS, N., BOURQUE, B.D., BUENO, F.T., HASTEY, R.P., MAUS, D.L., FERRY, A., DAVIS, D.A., 2009. Spawning of red snapper (*Lutjanus campechanus*) in response to hormonal induction or environmental control in a hatchery setting. *Rev. Fish. Sci.* 17, 149–155. doi:10.1080/10641260802505689

PSENICKA et al., Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. *Biology of the Cell*, v.99 (2), p.103-115, 2007.

PUDNEY, J., Spermatogenesis in non mammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.*, v.32, p.459–497, 1995.

RAINIS, S., MYLONAS, C.C., KYRIAKOU, Y., DIVANACH, P., Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. *Aquaculture*, v.219, p.873–890, 2003.

REGO, J.P.A., CRISP, J.M., MOURA, A.A., NOUWENS, A.S., LI, Y., VENUS, B., CORBET, N.J., CORBET, D.H., BURNS, B.M., BOE-HANSEN, G.B., MCGOWAN, M.R., Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 148, 1–17. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.04.016, 2014.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P., Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, v. 55, p.1-7, 2003.

RICHARDS, W. J. e V. P. SAKSENA. 1980. Description of larvae and early juveniles of laboratory reared gray snapper, *Lutjanus griseus* (Linnaeus) (Pisces, Lutjanidae). Bulletin of Marine Science 30:515-521.

RILEY, K. L. et al. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). Aquaculture, v. 238, p. 183–194, 2004.

RIVERA-ARRIAGA, E.; LARA-DOMÍNGUEZ, A.; RAMOS-MIRANDA, J.; SÁNCHEZ-GIL, P. & YÁNEZ-ARANCIBIA, A. Ecology and population dynamics of *Lutjanus synagris* on Campeche Bank. ICLARM, Manila, n.48, p.11-18, 1996.

RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Efeito da adição de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) ao diluidor à base de tris sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado, Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v.26, n.2, p.32-49, 1998.

RODRÍGUEZ-VILLAMIL, P., HOYOS-MARULANDA, V., MARTINS, J.A.M., OLIVEIRA, A.N., AGUIAR, L.H., MORENO, F.B., VELHO, A.L.M.C.S., MONTEIRO-MOREIRA, A.C., MOREIRA, R.A., VASCONCELOS, I.M., BERTOLINI, M., MOURA, A.A., Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. Theriogenology 85, 540–554. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.044, 2016.

ROTTMANN,R.W., SHIREMAN, J.V.E CHAPMAN , F.A., Hormonal Control of Reproduction in Fish for Induced Spawning, Southern Regional Aquaculture Center, No. 424, 1991.

ROUXEL et al., Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) sperm quality during the spawning season, Aquaculture Research, v.39, p.434-440, 2008.

RURANGWA, E., ROELANTS, I., HUYSKENS, G., EBRAHIMI, M., KIME, D.E., OLLEVIER, F., The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. J. Fish Biol., v.53, p.402–413, 1998.

SALLES R, FONTELES-FILHO AA, FURTADO-NETO MAA, CARR SM e FREITAS SM. 2006. Morphometric and mitochondrial DNA analyses of the Caribbean red snapper, *Lutjanus purpureus* (Teleostei, Lutjanidae), in western Atlantic off Northern Brazil. Bol Inst Pesca 32/2: 115-125.

SANCHES, E.G., OLIVEIRA, I.R., SERRALHEIRO, P.C.S., Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*, Bioikos, v.22(2), p.81-90, 2008.

SANCHES, E.G., CERQUEIRA, V.R., Refrigeração do sêmen de ariacó, *Lutjanus synagris*, Boletim do Instituto de Pesca, são Paulo, v.36, n.4, p.293-305, 2010.

SANCHES, E.G., OLIVEIRA, I.R., SERRALHEIRO, P.C.S, CERQUEIRA, V. R., 2015. Sperm cryopreservation of lane snapper *Lutjanus synagris* 75, 662–669. doi:10.1590/1519-6984.20613

SANSONE, G., FABBROCINI, A., IEROPOLI, S., LANGELLOTTI, A.L., OCCIDENTE, M., MATASSINO, D., 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44, 229–239. doi:10.1016/S0011-2240(02)00026-3

SCHIAVONE et al., Human chorionic gonadotropin induces spermatogenesis and spermiation in 1-year-old European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Assessment of sperm quality, *Aquaculture*, v.255, p.522–531, 2006.

SCHLATTNER, U., KLAUS, A., RAMIREZ RIOS, S., GUZUN, R., KAY, L., TOKARSKA-SCHLATTNER, M., Cellular compartmentation of energy metabolism: creatine kinase microcompartments and recruitment of B-type creatine kinase to specific subcellular sites. *Amino Acids* 48, 1751–1774. doi:10.1007/s00726-016-2267-3, 2016.

SCHULZ, R.W. & MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 43–56. 2002.

SCHULZ, R.W., DE FRANÇA, L.R., LAREYRE, J.-J., LE GAC, F., LEGAC, F., CHIARINI-GARCIA, H., NOBREGA, R.H., MIURA, T., Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013, 2010.

SEFFF, P.; PARTELOW, S.; INDRIANA, L. F.; BUHARI, N.; KUNZMANN, A. Improving pond aquaculture production on Lombok, Indonesia, *Aquaculture* v. 497: 64-73, 2018.

SIMPFENDORFER, C.A., DULVY, N.K. Bright spots of sustainable shark fishing. *Current Biology* 27: R97-R98. 2017.

SNEL, B., LEHMANN, G., BORK, P., HUYNEN, M.A, STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res.* 28, 3442–3444. doi:10.1093/nar/28.18.3442, 2000.

SOUSA JÚNIOR, V. B., SILVA, J. R. F., SALLES, R., Análise ovariana do ariacó, *Lutjanus synagris* (Actinopterygii: Lutjanidae) e considerações sobre sua reprodução no estado do Ceará, *Arquivo de Ciências do Mar*, v. 48(1), p.90-97, 2008.

SOUZA, R. L. M. Reprodução induzida de ariacó, *Lutjanus synagris* (Bloch, 1772) em cativeiro. 2012. Tese de Doutorado. Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará. 132p.

SOUZA, R. L. M., VETTORAZZI, M.B., KOBAYASHI, R.K., NETO, M.A.A.F., Eugenol as an anaesthetic in the management of farmed lane snapper, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758). *Rev. Cienc. Agron.* 46, p. 532-538. 2015.

SOUZA, R. L. M.; VETTORAZZI, M. B.; KOBAYASHI, R. K.; FURTADO NETO, M. A. A. Reprodução induzida de ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758) sob cultivo, em resposta a indução hormonal. *Arquivos de Ciências do Mar.* , v.49,n.2, p.68 - 76, 2016.

SPEYER, B.E., PIZZEY, A.R., RANIERI, M., JOSHI, R., DELHANTY, J.D.A., SERHAL, P., 2010. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum.Reprod.* 25, 1609–1618. doi:10.1093/humrep/deq116

SREEDHAR, A.S., CSERMELY, P., 2004. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. *Pharmacol. Ther.* 101, 227–257. doi:10.1016/j.pharmthera.2003.11.004

STACEY, N., Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiol. Biochem.*, v.28, p.229–235, 2003.

STEELE, J.H., M. SCHUMACHER, Ecosystem structure before fishing, *Fisheries Research*, v.44, p. 201-205, 2000.

STEIN, R. W.; MULL, C.G.; KUHN, T. S.; ASVHLIMAN, N.C; DAVIDSON, L. N. K.; JOY, J. B.; SMITH, G. J.; DULVY, N. K.; MOOERS, A. O. Global priorities for conserving the evolutionary history of sharks, rays and chimaeras. *Nature Ecology & Evolution* 2, 288-298, 2018.

STOSS, J., Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In HOAR, W. S., RANDALL, D. J. & DONALDSON, E. M., *Fish Physiology*, Vol. IX pp. 305–350. New York, NY: Academic Press, 1983.

STREIT JR, D.P., MORAES, G.V., RIBEIRO, R.P., Comparação do sêmen de curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido pro extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa, *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*, v.41, p. 147-153,

2004.

STREIT JR., D.P, BENITES, C., MORAES, G.V., RIBEIRO, R.P., SAKAGUTI, E.S., CALDIERI, R.F. 2006. Sêmen de pacu (*Piractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. Cien. Anim. Bras. 7, 289–97.

STREIT JR., D.P., SIROL, R.N, RIBEIRO, R.P, MORAES, G.V, GALO, J.M., DIGMYER, M. 2008 a. Parâmetros qualitativos do sêmen dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. B. Inst. Pesca. 34, 337–44.

STREIT JR., D.P., SIROL, R.N., RIBEIRO, R.P., MORAES, G.V., VARGAS, L.D.M., WATANABE, A.L. 2008 b. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongates*, Valenciennes, 1850). Braz. J. Biol. 68, 373–7.

STREIT JR. et al. Motilidade, Vigor e Patologias Seminal In Natura e Pós Criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*, B. Inst. Pesca, São Paulo, v.35(2), p.159 - 167, 2009.

STRZEZEK, J; WYSOCKI, P; KORDAN, W; KUKLINSKA, M. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. Reproduction Biology, v.5, p. 279–290, 2005.

SUQUET, M. et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Resesarch, v. 31, p. 231–43. 2000.

SUQUET et al., Sperm features of captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*), J. Appl. Ichthyol., v.26, p.775–778, 2010.

SWANN K, PARRINGTON J (1999) Mechanism of Ca²⁺ release at fertilization in mammals. J Exp Zool 285:267–275. doi: 10.1002/(SICI)1097-010X(19991015)285:3<267::AIDJEZ10[3.0.CO;2-P

TADDEI, A. R., BARBATO, F., ABELLI, L. et al. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). Cryobiology, San Diego, v.42 (4), p.244-255, 2001.

TAKAI, H.; MORISAWA, M., Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. J. Cell. Sci., v.108, p.1175–1181, 1995.

TIBA, R.M.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S.; OSTINI, S. Diluentes e proporções sêmen: diluente na crioconservação do sêmen do robalo-peva *Centropomus parallelus*. Boletim do Instituto de Pesca, v.35, p.99-110, 2009.

TIERSCH et al., Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), Aquaculture Research, v.35, p.278-288, 2004.

TÖPFER-PETERSEN, E., ROMERO, A., VARELA, P.F., EKHLASI-HUNDRIESER, M., DOSTÁLOVÁ, Z., SANZ, L., CALVETE, J.J., Spermadhesins: a new protein family. Facts,

hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30, 217–224. doi:10.1111/j.1439-0272.1998.tb01163.x, 1998.

TURANO, M. J., DAVIS, D. A., ARNOLD, C. R., Observations and techniques for maturation, spawning and larval rearing of the yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus*. *Journal of Aquaculture Society*, v. 31 (1), 2000.

TUSET, V. M.; TRIPPEL, E. A.; DE MONSERRAT, J., Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. *J. Appl. Ichthyol.*, v.24, p.398–405, 2008.

VALE FILHO, V.R. *Patologia do sêmen*. 2.ed. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, 54p. , 1980.

VAN TILBURG, M.F., RODRIGUES, M.A.M., MOREIRA, R.A., MORENO, F.B., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O., CÂNDIDO, M.J.D., MOURA, A.A, Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. *Theriogenology* 79, 1247–1261. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.013, 2013.

VETTORAZZI, M.B., TEIXEIRA, E.G., SOUZA, R.L.M., CÉSAR, J.R.O. FURTADO-NETO, M.A.A., Motilidade espermática do sêmen do Ariacó, *Lutjanus synagris*. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 43, n. 2, p. 21-26, 2010.

VETTORAZZI, M.B., Caracterização do sêmen de ariacó, *Lutjanus synagris* (LINNAEUS, 1758), Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, 90p., Fortaleza, Ceará, Brasil, 2012.

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

VULTHIPHANDCHAI, V., CHOMPHUTHAWACH, S., NIMRAT, S., Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity, *Theriogenology*, vol. 72, p.129-138, 2009.

WATANABE, W. O.; ELLIS, S. C.; ELLIS, E. P.; HEAD, W. D.; KELLEY, C. D.; MORIWAKE, A.; LEE, G. S.; BIENFANG, P. K. Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. *Aquaculture*, [Amsterdam], v. 138, n. 1-4, p. 205-219, 1995.

WATANABE, W. O., E. P. ELLIS, S. C. ELLIS, J. CHAVES, C. MANFREDI, R. H. HAGOOD, M. SPARSIS, S. ARNESON. 1998. Artificial propagation of mutton snapper, *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 29:176-187.

WATANABE, W. O., D. D. BENETTI, M. W. FEELEY, D. A. DAVIS, R. P. PHELPS. 2001. Status of artificial propagation of mutton, yellowtail, and red snapper (Family Lutjanidae) in the southeastern U. S. Page 681 in *Aquaculture America 2001: Book of Abstracts*. 21-25 January 2001, Orlando, Florida. US Chapter of the World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

WATANABE, W., D. BENETTI, W. FEELEY, D. DAVIS, R. PHELPS. 2005. Status of the artificial propagation of the mutton, yellowtail, and red snapper (family Lutjanidae) in the southeastern United States. Pages 517-540 in: A.M. Kelly and J. Silverstein (eds.) Aquaculture in the 21st century. American Fisheries Society Symposium # 46. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland USA

WOJTCZAK, M., DIETRICH, G.J., CIERESZKO, A., Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma 19, 387–391. doi:10.1016/j.fsi.2005.01.009, 2005.

WOJTCZAK, M., DIETRICH, G.J., IRNAZAROW, I., JURECKA, P., SŁOWIŃSKA, M., CIERESZKO, A., Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: Relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 148, 426–431. doi:10.1016/j.cbpb.2007.07.011, 2007.

WORM B, BARBIER EB, BEAUMONT N, DUFFY JE, FOLKE C, HALPERN BS, JACKSON JBC, LOTZE HK, MICHELI F, PALUMBI SR, SALA E, SELKOE K, STACHOWICZ JJ, WATSON R. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. **Science** 314:787-790, 2006.

WORM B (2016) Averting a global fisheries disaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences Early Edition*, doi:10.1073/pnas.1604008113

WORM, B. & TITTENSOR, D. *A Theory of Global Biodiversity*. Princeton; Oxford: Princeton University Press. 2018.

WU, C., Heat shock transcription factors: structure and Regulation translocation , higher order assembly , and protein degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 441–469. 1995.

WU, Y., PEI, Y., QIN, Y., Developmental expression of heat shock proteins 60, 70, 90, and A2 in rabbit testis. *Cell Tissue Res.* 344, 355–363. doi:10.1007/s00441-011-1151-4, 2011.

YANG et al., Effect of osmotic immobilization on refrigerated storage and cryopreservation of sperm from a viviparous fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*, *Cryobiology*, v.52. p.209–218, 2006.

YANAGIMACHI, R., CHERR, G., MATSUBARA, T., ANDOH, T., HARUMI, T., VINES, C., PILLAI, M., GRIFFIN, F., MATSUBARA, H., WEATHERBY, T., KANESHIRO, K., Sperm attractant in the micropyle region of fish and insect eggs. *Biol. Reprod.* 88, 47. doi:10.1095/biolreprod.112.105072, 2013

YARON, Z., Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, v.129, p.49–73, 1995.

YI, Y.-J., MANANDHAR, G., SUTOVSKY, M., LI, R., JONAKOVA, V., OKO, R., PARK, C.-S., PRATHER, R.S., SUTOVSKY, P., Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-Activity Is Involved in Sperm Acrosomal Function and Anti-Polyspermy Defense During Porcine Fertilization. *Biol. Reprod.* 77, 780–793. doi:10.1095/biolreprod.107.061275, 2007.

ZINI, A., SCHLEGEL, P.N., Effect of hormonal manipulation on mRNA expression of antioxidant enzymes in the rat testis. *J. Urol.* 169, 767–771.

doi:10.1097/01.ju.0000049915.87039.f3, 2003

ZOHAR, Y., Fish reproduction: Its physiology and artificial manipulation. In: SHILO, M. AND SARIG, S. (eds.), *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, pp. 65–119, 1989.

ZOHAR, Y., MYLONAS, C.C., Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes, *Aquaculture* 197, 99–136, 2001.

APÊNDICE 1

Tabela 1 Suplementar – Tipos de bandas, proteínas, suas massas moleculares, número de acesso, sequência coberta, número de peptídeos únicos, sequência de peptídeos, ion escore, relação m/z e cargas das proteínas do sêmen de ariacó tratados com hCG e controle.

Band type	Protein	Accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z	z
1	MAGUK p55 subfamily member 7	MPP7_DANRE	28	4	⁽¹⁵⁵⁾ KDEHTGAILVAR ⁽¹⁶⁶⁾	4	436.8837	3
					⁽²⁸⁵⁾ AGLIPSKHFQER ⁽²⁹⁶⁾	28	691.3321	2
	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 isoform X1	974072266	120	2	⁽⁹⁰⁾ NVILGGVR ⁽⁹⁷⁾	32	414.2593	2
					⁽⁹⁰⁾ NVILGGVR ⁽⁹⁷⁾	32	414.7495	2
					⁽⁷⁹⁶⁾ VPVFTPR ⁽⁸⁰²⁾	48	408.2359	2
				⁽¹⁰¹¹⁾ LDLPMTEIVTK ⁽¹⁰²¹⁾	42	638.3431	2	
2	Borealin	BORE1_CHICK	30	3	⁽²⁰³⁾ GGASIVTPR ⁽²¹¹⁾	30	428.7642	2
					⁽²⁰³⁾ GGASIVTPR ⁽²¹¹⁾	24	428.7647	2
	Endoplasmin	ENPL_BOVIN	40	1	⁽³⁸⁵⁾ SILFVPTSAPR ⁽³⁹⁵⁾	40	594.3367	2
	Extracellular matrix protein 2	ECM2_MOUSE	40	1	⁽⁴⁸¹⁾ KITMIILR ⁽⁴⁸⁸⁾	27	494.2988	2
					⁽⁴⁸¹⁾ KITMIILR ⁽⁴⁸⁸⁾	40	502.2918	2
	Glutamine-rich protein 2	QRIC2_HUMAN	42	1	⁽⁹²⁷⁾ DREQFLELVSR ⁽⁹³⁷⁾	13	696.3578	2
					⁽¹³²⁶⁾ SALATKVSR ⁽¹³³⁴⁾	41	466.7441	2
					⁽¹³²⁶⁾ SALATKVSR ⁽¹³³⁴⁾	30	466.7472	2
					⁽¹³²⁶⁾ SALATKVSR ⁽¹³³⁴⁾	41	467.2400	2
	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	PSP1_PIG	47	21	⁽⁷⁷⁾ EYVEILEGAPGSK ⁽⁸⁹⁾	45	696.3578	2
				⁽¹¹⁵⁾ DSGHPASPYEIIFLR ⁽¹²⁹⁾	38	567.9550	3	
Spermatogenesis associated protein 5-like protein 1	SPA5L_XENTR	36	1	⁽⁴⁷¹⁾ QSIEWPMK ⁽⁴⁷⁸⁾	36	517.2700	2	
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	410905785	82	2	⁽⁴⁰⁵⁾ GDQIGIAPR ⁽⁴¹³⁾	29	463.7526	2	
				⁽⁴⁵¹⁾ SGTNPSEAFR ⁽⁴⁶⁰⁾	53	533.2524	2	

3	Protein disulfide-isomerase A4	597782620	103	3	(132)FEVSGYPTIK ⁽¹⁴¹⁾	33	570.7943	2
					(235)VDATVENDLASR ⁽²⁴⁶⁾	71	645.3169	2
	Transferin	954330816	54	2	(253)VPAHAVVSR ⁽²⁶¹⁾	15	468.2631	2
					(253)VPAHAVVSR ⁽²⁶¹⁾	22	312.5136	3
					(253)VPAHAVVSR ⁽²⁶¹⁾	21	468.2697	2
					(607)ILLEQQT ⁽⁶¹⁴⁾	32	486.7855	2
4	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_ICTPU	445	20	(26)VEIANDQGNR ⁽³⁶⁾	76	614.8158	2
					(50)LIGDAAK ⁽⁵⁶⁾	11	344.2021	2
					(129)EIAEAYLGK ⁽¹³⁷⁾	27	496.7710	2
					(129)EIAEAYLGK ⁽¹³⁷⁾	27	497.2566	2
					(160)DAGTISGLNVLR ⁽¹⁷¹⁾	72	608.3358	2
					(160)DAGTISGLNVLR ⁽¹⁷¹⁾	78	608.3360	2
					(172)IINEPTAAAIAYGLDK ⁽¹⁸⁷⁾	50	830.4514	2
					(172)IINEPTAAAIAYGLDK ⁽¹⁸⁷⁾	2	596.6598	3
					(221)STAGDTHLGGEDFDNR ⁽²³⁶⁾	39	564.5738	3
					(302)FEELNADLFR ⁽³¹¹⁾	68	627.3071	2
					(312)GTLDPVEK ⁽³¹⁹⁾	33	429.7275	2
					(312)GTLDPVEK ⁽³¹⁹⁾	33	430.2313	2
					(349)LLQDFFNGK ⁽³⁵⁷⁾	5	541.2808	2
					(349)LLQDFFNGK ⁽³⁵⁷⁾	5	541.7747	2
					(417)NTTIPTK ⁽⁴²³⁾	13	387.7164	2
					(459)FELTGIPPAPR ⁽⁴⁶⁹⁾	44	599.3315	2
					(459)FELTGIPPAPR ⁽⁴⁶⁹⁾	63	599.3325	2
					(459)FELTGIPPAPR ⁽⁴⁶⁹⁾	48	599.3325	2
					(501)ITITNDK ⁽⁵⁰⁷⁾	4	402.7222	2
					(501)ITITNDK ⁽⁵⁰⁷⁾	32	402.7229	2
					(525)YKAEDDVQR ⁽⁵³³⁾	26	375.1791	3
(527)AEDDVQR ⁽⁵³³⁾	1	416.7468	2					

Heat shock cognate 71	301666348	525	20	(26)VEIIANDQGNR ⁽³⁶⁾	63	614.8144	2
				(37)TTPSYVAFTDSER ⁽⁴⁹⁾	81	737.3447	2
				(50)LIGDAAK ⁽⁵⁶⁾	21	344.2021	2
				(57)NQVAMNPTNTVFDAK ⁽⁷¹⁾	13	833.3994	2
				(57)NQVAMNPTNTVFDAK ⁽⁷¹⁾	13	833.8961	2
				(160)DAGTISGLNVLR ⁽¹⁷¹⁾	75	608.3336	2
				(221)STAGDTHLGGEDFDNR ⁽²³⁶⁾	30	564.5737	3
				(237)MVNHFIGEFK ⁽²⁴⁶⁾	22	619.3046	2
				(302)FEELNADLFR ⁽³¹¹⁾	61	627.3058	2
				(312)GTLDPVEK ⁽³¹⁹⁾	27	429.7272	2
				(459)FELTGIPPAPR ⁽⁴⁶⁹⁾	47	599.3300	2
				(501)ITITNDK ⁽⁵⁰⁷⁾	47	402.7219	2
				(540)NGLESYAFNMK ⁽⁵⁵⁰⁾	41	645.2970	2
(540)NGLESYAFNMK ⁽⁵⁵⁰⁾	41	645.7853	2				
Heat shock protein 70	308390281	200	5	(28)VEIIANDQGNR ⁽³⁸⁾	63	614.8144	2
				(52)LIGDAAK ⁽⁵⁸⁾	21	344.2021	2
				(461)FELTGIPPAPR ⁽⁴⁷¹⁾	47	599.3300	2
				(501)NKITITNDK ⁽⁵⁰⁹⁾	22	523.2820	2
				(503)ITITNDK ⁽⁵⁰⁹⁾	47	402.7219	2
				5 Heat shock cognate 70	1007731344	226	7
(37)TTPSYVAFTDTER ⁽⁴⁹⁾	69	744.3522	2				
(160)DAGTISGLNVLR ⁽¹⁷¹⁾	47	608.3469	2				
(302)FEELNADLFR ⁽³¹¹⁾	46	627.3095	2				
308390281	151	5	(28)VEIIANDQGNR ⁽³⁸⁾		64	614.8168	2
			(39)TTPSYVAFTDTER ⁽⁵¹⁾		69	744.3522	2
			(501)NKITITNDK ⁽⁵⁰⁹⁾		18	523.2845	2

6	Alpha-tubulin	2599500	375	24	(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	69	851.3590	2			
					(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	65	851.3679	2			
					(85)QLFHPEQLITGK ⁽⁹⁶⁾	23	470.8698	3			
					(113)ELIDLVLDR ⁽¹²¹⁾	43	543.2475	2			
					(157)LSVDYGK ⁽¹⁶³⁾	14	391.1535	2			
					(157)LSVDYGKK ⁽¹⁶⁴⁾	29	455.2027	2			
					(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	77	573.5450	3			
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	42	586.2497	3			
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	21	878.8748	2			
					(340)TIQFVDWCPTGFK ⁽³⁵²⁾	31	799.8024	2			
					(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	23	912.8950	2			
					(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	28	912.8973	2			
					(395)FDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	19	452.1697	2			
					NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial	410896574	109	5	(194)AIVVTDGER ⁽²⁰²⁾	54	480.1978
(203)ILGLGDLGSYGMGIPV GK ⁽²²⁰⁾	20	881.8748	2								
(546)LYPPLSTIR ⁽⁵⁵⁴⁾	34	530.2592	2								
Tubulin alpha-1B chain-like isoform X1	1007738250	231	14	(85)QLFHPEQLITGK ⁽⁹⁶⁾	23	470.8698	3				
				(113)EMVDLVLDR ⁽¹²¹⁾	29	545.2474	2				
				(157)LSVDYGK ⁽¹⁶³⁾	14	391.1535	2				
				(157)LSVDYGKK ⁽¹⁶⁴⁾	29	455.2027	2				
				(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	77	573.5450	3				
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	42	586.2497	3				
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	21	878.8748	2				
				(395)FDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	19	452.1697	2				
				Tubulin alpha-1C chain-like	551498429	164	12	(118)EIIDIVLDR ⁽¹²⁶⁾	43	543.2475	2
								(162)LSVDYGK ⁽¹⁶⁸⁾	14	391.1535	2
(162)LSVDYGKK ⁽¹⁶⁹⁾	29	455.2027	2								
(345)TIQFVDWCPTGFK ⁽³⁵⁷⁾	31	799.8024	2								
(358)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁵⁾	23	912.8950	2								
(358)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁵⁾	28	912.8973	2								
(400)FDLMYAK ⁽⁴⁰⁶⁾	19	452.1697	2								

Tubulin alpha-ID chain-like	1025292011	246	19	(85)QLFHPEQLITGK ⁽⁹⁶⁾	23	470.8698	3
				(157)LSVDYGK ⁽¹⁶³⁾	14	391.1535	2
				(157)LSVDYGKK ⁽¹⁶⁴⁾	29	455.2027	2
				(216)NLNIERTPTYNLNR ⁽²²⁹⁾	60	573.5450	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	42	586.2497	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	21	878.8748	2
				(340)TIQFVDWCPTGFK ⁽³⁵²⁾	31	799.8024	2
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	23	912.8950	2
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	28	912.8973	2
				(395)FDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	19	452.1697	2
Tubulin beta chain-like isoform X1	617423779	361	13	(245)FPGQLNADLR ⁽²⁵⁴⁾	84	565.7313	2
				(256)LAVNMVPPFR ⁽²⁶⁵⁾	83	580.2613	2
				(266)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁹⁾	39	546.2090	3
				(266)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁹⁾	49	546.2188	3
				(313)YLTVA AIFR ⁽³²¹⁾	26	527.2429	2
				(354)TAVCDIPPR ⁽³⁶²⁾	53	514.6961	2
				(384)LSEQFTAMFR ⁽³⁹³⁾	65	623.2220	2
				Tubulin beta chain-like isoform X2	583998872	440	14
(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	84	565.7313	2				
(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	83	580.2613	2				
(263)LAVNMVPPFR ⁽²⁷⁶⁾	52	546.2188	3				
(263)LAVNMVPPFR ⁽²⁷⁶⁾	39	546.2090	3				
(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	53	514.6961	2				
(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	65	623.2220	2				
Tubulin beta-1	14195231	468	20				
				(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	70	668.2569	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	84	565.7313	2
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	83	580.2613	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	39	546.2090	3
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	546.2188	3
				(310)YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	26	527.2429	2
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	53	514.6961	2
				(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	65	623.2220	2

Tubulin beta-2A chain-like	938082569	330	14	(226)FPGQLNADLR ⁽²³⁵⁾	84	565.7313	2
				(237)LAVNMVPPFR ⁽²⁴⁶⁾	83	580.2613	2
				(247)LHFFMPGFSPLTSR ⁽²⁶⁰⁾	18	546.2188	3
				(294)YLTVA AIFR ⁽³⁰²⁾	26	527.2429	10
				(335)TAVCDIPPR ⁽³⁴³⁾	53	514.6961	2
				(365)ISEQFTAMFR ⁽³⁷⁴⁾	65	623.2220	2
Tubulin beta-4A chain	992172806	440	17	(91)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁰²⁾	70	668.2569	2
				(170)FPGQLNADLR ⁽¹⁷⁹⁾	84	565.7313	2
				(181)LAVNMVPPFR ⁽¹⁹⁰⁾	83	580.2613	2
				(191)LHFMMPGFAPLTSR ⁽²⁰⁴⁾	52	546.2188	3
				(191)LHFMMPGFAPLTSR ⁽²⁰⁴⁾	39	546.2090	3
				(279)TAVCDIPPR ⁽²⁸⁷⁾	53	514.6961	2
				(309)ISEQFTAMFR ⁽³¹⁸⁾	65	623.2220	2
Tubulin beta-4B chain-like	928081090	155	13	(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	37	809.3209	2
				(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	70	668.2569	2
				(242)FPGQPNDLSR ⁽²⁵¹⁾	48	565.7313	2
7 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	617432022	69	3	(290)AIQLEYSEAR ⁽²⁹⁹⁾	26	590.3087	2
				(368)FNQALEQFGEK ⁽³⁷⁸⁾	45	655.8176	2
Alpha-tubulin	2599500	156	14	(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	64	851.4500	2
				(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	41	573.6273	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	35	586.3154	3
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	16	912.9972	2
Beta-2 tubulin	5923889	142	5	(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	83	565.8006	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	58	546.2777	3
Heat shock protein 60	748762281	124	5	(93)ATYQEGLR ⁽¹⁰⁰⁾	52	469.2313	2
				(351)LAYINPELALEEK ⁽³⁶³⁾	40	751.9080	2
				(453)ALELDSSSK ⁽⁴⁶¹⁾	38	475.2433	2

NADP-dependent malic enzyme-like	961896357	292	10	(76)GMAFTLEER ⁽⁸⁴⁾	49	535.2523	2
				(121)YILLMTLQDR ⁽¹³⁰⁾	59	641.3454	2
				(196)AIVVTDGER ⁽²⁰⁴⁾	59	480.2616	2
				(196)AIVVTDGER ⁽²⁰⁴⁾	59	480.7598	2
				(205)ILGLGDLGSYGMGIPVGK ⁽²²²⁾	22	881.9736	2
				(477)GIFASGSPFDK ⁽⁴⁸⁷⁾	72	563.2806	2
Stress induced phosphoprotein-1	551498548	154	6	(548)LYPPLSTIR ⁽⁵⁵⁶⁾	31	530.7863	2
				(14)ALSAGNIDEAVR ⁽²⁵⁾	76	608.3146	2
				(350)LAYINPELALEEK ⁽³⁶²⁾	40	751.9080	2
Tubulin alpha-1B chain-like	1041092531	140	10	(452)ALELDSSSK ⁽⁴⁶⁰⁾	38	475.2433	2
				(64)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁸⁾	64	851.4500	2
				(215)DLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁸⁾	41	573.6273	3
				(264)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁷⁹⁾	35	586.3154	3
Tubulin alpha-1D chain-likeT	1025292011	80	10	(216)NLNIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	30	573.6273	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	35	586.3154	3
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	16	912.9972	2
Tubulin beta-1 chain	549053	66	4	(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	27	565.7997	2
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	39	580.3177	2
Tubulin beta-2A chain-like	938082569	112	5	(226)FPGQLNADLR ⁽²³⁵⁾	83	565.8006	2
				(247)LHFFMPGFSPLTSR ⁽²⁶⁰⁾	23	546.2777	3
Tubulin, alpha 8 like 4	41055710	104	14	(65)AVFVDLEPTVINEVR ⁽⁷⁹⁾	12	851.4500	2
				(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	41	573.6273	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	35	586.3154	3
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	16	912.9972	2
Wap65-2	658307163	66	2	(253)LDAITDDAGK ⁽²⁶³⁾	66	560.2784	2
Wap65-2 precursor	728894940	133	5	(249)IDAITDDAGK ⁽²⁵⁹⁾	66	560.2784	2
				(317)SGPVYTLIEGYPK ⁽³²⁹⁾	67	712.8742	2

8	Tubulin alpha-1C chain	1020468675	576	28					
					(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	102	851.3950	2	
					(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	98	851.3953	2	
					(85)QLFHPEQLITGK ⁽⁹⁶⁾	20	470.8825	3	
					(85)QLFHPEQLITGK ⁽⁹⁶⁾	48	705.8318	2	
					(85)QLFHPEQLITGK ⁽⁹⁶⁾	49	706.3313	2	
					(97)EDAANNYAR ⁽¹⁰⁵⁾	56	512.1728	2	
					(113)EIIDLVLDR ⁽¹²¹⁾	53	543.2654	2	
					(157)LSVDYGK ⁽¹⁶³⁾	39	391.1652	2	
					(157)LSVDYGKK ⁽¹⁶⁴⁾	41	455.2101	2	
					(244)FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR ⁽²⁶⁴⁾	56	803.6590	3	
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	53	586.2655	3	
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	71	878.9133	2	
					(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	22	912.9194	2	
					(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	23	912.9249	2	
					(391)LNHKFDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	49	466.1844	3	
					(395)FDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	21	452.1771	2	
					(423)EDMAALEK ⁽⁴³⁰⁾	17	461.6622	2	

Tubulin beta chain-like isoform X1	941768480	691	28				
				(170)IREEYPDR ⁽¹⁷⁷⁾	42	539.2079	2
				(178)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁸⁹⁾	83	668.2817	2
				(257)FPGQLNADLR ⁽²⁶⁶⁾	93	565.7436	2
				(257)FPGQLNADLR ⁽²⁶⁶⁾	98	565.7462	2
				(257)FPGQLNADLR ⁽²⁶⁶⁾	98	566.2403	2
				(257)FPGQLNADLR ⁽²⁶⁶⁾	47	420.1823	3
				(268)LAVNMVPPFR ⁽²⁷⁷⁾	64	580.2562	2
				(278)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁹¹⁾	50	546.2229	3
				(278)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁹¹⁾	45	546.2332	3
				(278)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁹¹⁾	49	818.8586	2
				(313)NMMAACDPR ⁽³²¹⁾	54	549.1313	2
				(336)MSMKEVDEQMLNVQNK ⁽³⁵¹⁾	32	657.8968	3
				(340)EVDEQMLNVQNK ⁽³⁵¹⁾	47	731.7773	2
				(352)NSSYFVEWIPNNVK ⁽³⁶⁵⁾	23	848.8543	2
				(366)TAVCDIPPR ⁽³⁷⁴⁾	33	514.7111	2
				(366)TAVCDIPPR ⁽³⁷⁴⁾	62	514.7120	2
				(378)MSSTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁹⁴⁾	28	937.3863	2
				(396)ISEQFTAMFR ⁽⁴⁰⁵⁾	61	623.2344	2

Tubulin beta-2A chain-like isoform X2	617423782	723	28					
				(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	86	653.5965	3	
				(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	42	539.2079	2	
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7436	2	
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7462	2	
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	566.2403	2	
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	47	420.1823	3	
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	64	580.2562	2	
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	50	546.2229	3	
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	45	546.2332	3	
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	818.8586	2	
				(298)NMMAACDPR ⁽³⁰⁶⁾	54	549.1313	2	
				(310)YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	58	527.2686	2	
				(321)MSMKEVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	32	657.8968	3	
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	731.7773	2	
				(337)NSSYFVEWIPNNVK ⁽³⁵⁰⁾	23	848.8543	2	
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	33	514.7111	2	
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	62	514.7120	2	
				(381)LSEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	61	623.2344	2	

Tubulin beta-4B chain

734615370

984

41

⁽⁶³⁾ AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	54	809.3478	2
⁽¹⁰⁴⁾ GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	86	653.5965	3
⁽¹⁵⁵⁾ IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	42	539.2079	2
⁽¹⁶³⁾ IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	83	668.2817	2
⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7436	2
⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7462	2
⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	566.2403	2
⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	47	420.1823	3
⁽²⁵³⁾ LA VNMVPFPR ⁽²⁶²⁾	64	580.2562	2
⁽²⁶³⁾ LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	50	546.2229	3
⁽²⁶³⁾ LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	45	546.2332	3
⁽²⁶³⁾ LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	818.8586	2
⁽²⁸³⁾ SLTVPELTQQMFDSK ⁽²⁹⁷⁾	27	862.3571	2
⁽²⁸³⁾ SLTVPELTQQMFDSK ⁽²⁹⁷⁾	34	862.3621	2
⁽²⁹⁸⁾ NMMAACDPR ⁽³⁰⁶⁾	54	549.1313	2
⁽³¹⁰⁾ YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	58	527.2686	2
⁽³²¹⁾ MSMKEVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	32	657.8968	3
⁽³²⁵⁾ EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	731.7773	2
⁽³³⁷⁾ NSSYFVEWIPNNVK ⁽³⁵⁰⁾	45	848.8543	2
⁽³⁵¹⁾ TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	33	514.7111	2
⁽³⁵¹⁾ TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	63	514.7120	2
⁽³⁶³⁾ MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	84	929.3438	2
⁽³⁶³⁾ MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	90	929.3758	2
⁽³⁶³⁾ MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	84	929.8376	2
⁽³⁸¹⁾ ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	61	623.2344	2

Tubulin beta-4B chain-like isoform X2	551498305	944	38				
				(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	54	809.3478	2
				(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	86	653.5965	3
				(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	42	539.2079	2
				(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	83	668.2817	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7436	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7462	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	566.2403	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	47	420.1823	3
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	64	580.2562	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	50	546.2229	3
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	45	546.2332	3
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	818.8586	2
				(298)NMMAACDPR ⁽³⁰⁶⁾	54	549.1313	2
				(310)YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	58	527.2686	2
				(321)MSMKEVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	32	657.8968	3
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	731.7773	2
				(337)NSSYFVEWIPNNVK ⁽³⁵⁰⁾	23	848.8543	2
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	33	514.7111	2
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	62	514.7120	2
				(363)MSATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	77	929.3438	2
				(363)MSATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	84	929.3758	2
				(363)MSATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	77	929.8376	2
				(363)MSATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	29	937.3863	2
				(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	61	623.2344	2

Tubulin beta-4B chain-like isoform X3	551490636	743	36	(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	54	809.3478	2
				(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	86	653.5965	3
				(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	42	539.2079	2
				(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	85	668.2817	3
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	64	580.2562	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	50	546.2229	3
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	45	546.2332	3
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	818.8586	2
				(298)NMMAACDPR ⁽³⁰⁶⁾	54	549.1313	2
				(310)YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	58	527.2686	2
				(321)MSMKEVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	32	657.8968	3
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	731.7773	2
				(337)NSSYFVEWIPNNVK ⁽³⁵⁰⁾	23	848.8543	2
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	33	514.7111	2
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	62	514.7120	2
				(363)MSSTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	28	937.3863	2
				(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	61	623.2344	2
Tubulin beta-5 chain isoform X1	973132562	565	26	(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	54	809.3478	2
				(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	86	653.5965	3
				(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	42	539.2079	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7436	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7462	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	566.2403	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	47	420.1823	3
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	64	580.2562	2
				(283)ALTVPELTQQMFDK ⁽²⁹⁷⁾	17	854.3698	2
				(298)NMMAACDPR ⁽³⁰⁶⁾	54	549.1313	2
				(337)NSSYFVEWIPNNVK ⁽³⁵⁰⁾	23	848.8543	2
				(363)MASTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	73	929.3438	2
				(363)MASTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	81	929.3758	2
				(363)MASTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	73	929.8376	2
				(363)MASTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	28	937.3863	2

9	Alpha-tubulin	2599500	364	20	(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	92	851.4541	2				
					(113)ELIDLVLDR ⁽¹²¹⁾	44	543.3091	2				
					(157)LSVDY GK ⁽¹⁶³⁾	13	391.2007	2				
					(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	81	573.6260	3				
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	54	586.3194	3				
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	52	878.9862	2				
					(340)TIQFVDWCPTGFK ⁽³⁵²⁾	58	799.8878	2				
					(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	22	912.9950	2				
					Beta-3 tubulin	5923887	393	16	(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	62	809.4080	2
									(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	43	539.2656	2
(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7946	2									
(253)LA VNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	61	580.3131	2									
(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	731.8421	2									
(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	732.3356	2									
(363)MSATFIGNSTAIQEIFK ⁽³⁷⁹⁾	59	929.4695	2									
(363)MSATFIGNSTAIQEIFK ⁽³⁷⁹⁾	89	929.4700	2									
(363)MSATFIGNSTAIQEIFK ⁽³⁷⁹⁾	59	929.9620	2									
Collagen alpha2(I) chain	CO1A2_ONCMY	25	0	(435)AGESGLTGAR ⁽⁴⁴⁴⁾					25	459.2456	2	
Tubulin alpha chain	TBA_ONCKE	70	14	(106)GHYTIGK ⁽¹¹²⁾	8	388.2049	2					
				(113)EIIDIVLDR ⁽¹²¹⁾	54	543.3117	2					
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	35	586.3159	3					
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	16	912.9966	2					
				(395)FDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	9	452.2156	2					
				(423)EDMAALEK ⁽⁴³⁰⁾	20	461.7106	2					
Tubulin alpha chain, testisspecific	TBAT_ONCMY	52	10	(106)GHYTIGK ⁽¹¹²⁾	8	388.2049	2					
				(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	52	573.6252	3					
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	16	912.9966	2					
				(395)FDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	9	452.2156	2					
Tubulin alpha-1B chain-like	1041092531	256	13	(64)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁸⁾	92	851.4541	2					
				(215)DLIERPTYTNLNR ⁽²²⁸⁾	81	573.6260	3					
				(229)LISQVVSSITASLR ⁽²⁴²⁾	30	737.4346	2					
				(264)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁷⁹⁾	54	586.3194	3					
				(264)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁷⁹⁾	52	878.9862	2					

Tubulin alpha-1C chain-like	551498429	138	10	(118)EIIDIVLDR ⁽¹²⁶⁾	44	543.3091	2
				(162)LSVDY GK ⁽¹⁶⁸⁾	13	391.2007	2
				(345)TIQFVDWCPTGFK ⁽³⁵⁷⁾	58	799.8878	2
				(358)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁵⁾	22	912.9950	2
Tubulin alpha-1D chain-like	1025292011	212	15	(157)LSVDY GK ⁽¹⁶³⁾	13	391.2007	2
				(216)NLNIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	64	573.6260	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	54	586.3194	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	52	878.9862	2
				(340)TIQFVDWCPTGFK ⁽³⁵²⁾	58	799.8878	2
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	22	912.9950	2
Tubulin beta chain-like isoform X1	617423779	575	22	(107)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²⁴⁾	94	653.6600	3
				(107)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²⁴⁾	35	979.9969	2
				(158)IREEYPDR ⁽¹⁶⁵⁾	43	539.2656	2
				(245)FPGQLNADLR ⁽²⁵⁴⁾	93	565.7946	2
				(256)LAVNMVPPFR ⁽²⁶⁵⁾	61	580.3131	2
				(266)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁹⁾	59	546.2754	3
				(313)YLTVA AIFR ⁽³²¹⁾	56	527.3029	2
				(328)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁹⁾	47	731.8421	2
				(328)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁹⁾	47	732.3356	2
				(354)TAVCDIPPR ⁽³⁶²⁾	56	514.7625	2
				(384)LSEQFTAMFR ⁽³⁹³⁾	66	623.2955	2
Tubulin beta-1 chain	TBB1_GADMO	172	15	(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	34	809.4094	2
				(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	36	668.3541	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	84	565.7988	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	47	546.2806	3
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	47	546.6172	3
				(310)YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	6	527.3043	2
				(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	11	623.2968	2

Tubulin beta-1 chain-like	736192163	883	38	(47)INVYYNEASGGK ⁽⁵⁸⁾	71	657.8168	2
				(63)AVLVDLEPGTMDSVR77 ⁽⁷⁷⁾	62	809.4080	2
				(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	94	653.6600	3
				(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	35	979.9969	2
				(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	43	539.2656	2
				(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	68	668.3472	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7946	2
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	61	580.3131	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	59	546.2754	3
				(283)ALTVPELTQQMFDSK ⁽²⁹⁷⁾	11	854.4248	2
				(310)YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	56	527.3029	2
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	731.8421	2
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	732.3356	2
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	56	514.7625	2
				(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	71	929.4695	2
				(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	96	929.4700	2
				(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	71	929.9620	2
				(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	66	623.2955	2
Tubulin beta-2A chain-like	938082569	563	26	(88)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹⁰⁵⁾	94	653.6600	3
				(88)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹⁰⁵⁾	35	979.9969	2
				(139)IREEYPDR ⁽¹⁴⁶⁾	43	539.2656	2
				(226)FPGQLNADLR ⁽²³⁵⁾	93	565.7946	2
				(237)LAVNMVPPFR ⁽²⁴⁶⁾	61	580.3131	2
				(247)LHFFMPGFSPLTSR ⁽²⁶⁰⁾	22	546.2754	3
				(267)ALTVPELTQQMFDAK ⁽²⁸¹⁾	26	854.4248	2
				(294)YLTVA AIFR ⁽³⁰²⁾	56	527.3029	2
				(309)EVDEQMLNVQNK ⁽³²⁰⁾	47	731.8421	2
				(309)EVDEQMLNVQNK ⁽³²⁰⁾	47	732.3356	2
				(335)TAVCDIPPR ⁽³⁴³⁾	56	514.7625	2
				(365)ISEQFTAMFR ⁽³⁷⁴⁾	66	623.2955	2

Tubulin beta-4B chain-like	432940581	898	38	(47)INVYYNEASGGK ⁽⁵⁸⁾	71	657.8168	2
				(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	62	809.4080	2
				(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	94	653.6600	3
				(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	35	979.9969	2
				(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	43	539.2656	2
				(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	68	668.3472	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7946	2
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	61	580.3131	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	59	546.2754	3
				(283)ALTVPELTQQMFDK ⁽²⁹⁷⁾	26	854.4248	2
				(310)YLTVAEIFR ⁽³¹⁸⁾	56	527.3029	2
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	731.8421	2
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	47	732.3356	2
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	56	514.7625	2
				(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	71	929.4695	2
				(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	96	929.4700	2
				(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	71	929.9620	2
				(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	66	623.2955	2
				Tubulin beta-5 chain isoform X1	973132562	455	20
(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	94	653.6600	3				
(104)GHYTEGAELVDSVLDVVR ⁽¹²¹⁾	35	979.9969	2				
(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	43	539.2656	2				
(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7946	2				
(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	61	580.3131	2				
(283)ALTVPELTQQMFDK ⁽²⁹⁷⁾	26	854.4248	2				
(363)MASTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	48	929.4695	2				
(363)MASTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	76	929.4700	2				
(363)MASTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	48	929.9620	2				

10	Alpha-tubulin	2599500	274	17	(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	32	851.3828	2
					(113)ELIDLVLDR ⁽¹²¹⁾	48	543.2543	2
					(157)ELIDLVLDR ⁽¹⁶³⁾	15	391.1561	2
					(157)LSVDYGK ⁽¹⁶⁴⁾	29	455.1868	2
					(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	86	573.5760	3
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	43	586.2275	3
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	27	878.8943	2
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	27	879.3494	2
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	43	586.6008	3
					(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	22	912.9152	2
	Alpha-tubulin	2599500	332	19	(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	78	851.4543	2
					(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	85	851.4543	2
					(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	88	851.4545	2
					(113)ELIDLVLDR ⁽¹²¹⁾	49	543.3092	2
					(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	79	573.6285	3
					(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	42	586.3166	3
					(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	29	912.9954	2
					(395)FDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	22	452.2133	2
					(423)EDMAALEK ⁽⁴³⁰⁾	22	461.7107	2
	Aspartyl aminopeptidase	213512925	77	4	(398)VGVPLQDVMVR ⁽⁴⁰⁸⁾	51	614.7851	2
					(460)GFFELFPTVR ⁽⁴⁶⁹⁾	28	606.7348	2
	Aspartyl aminopeptidase	213512925	70	4	(398)VGVPLQDVMVR ⁽⁴⁰⁸⁾	41	614.8384	2
					(460)GFFELFPTVR ⁽⁴⁶⁹⁾	31	606.8226	2

ATP synthase subunit beta, mitochondrial	938081194	695	28	⁽¹⁰²⁾ LVLEVAQHLGENTVR ⁽¹¹⁶⁾	47	559.9307	3
				⁽¹¹⁷⁾ TIAMDGTEGLVR ⁽¹²⁸⁾	87	639.7522	2
				⁽¹³²⁾ VIDTGAPIR ⁽¹⁴⁰⁾	62	471.2161	3
				⁽¹⁴¹⁾ IPVGPETLGR ⁽¹⁵⁰⁾	52	519.7670	2
				⁽¹⁵¹⁾ IMNVIGEPIDER ⁽¹⁶²⁾	53	701.2863	2
				⁽¹⁹⁶⁾ VVDLLAPYAK ⁽²⁰⁵⁾	52	544.7526	2
				⁽²⁰⁹⁾ IGLFGGAGVGK ⁽²¹⁹⁾	45	488.2374	2
				⁽²⁷²⁾ VALVYGQMNEPPGAR ⁽²⁸⁶⁾	55	809.3348	2
				⁽²⁸⁹⁾ VALTGLTVAEYFR ⁽³⁰¹⁾	63	720.3113	2
				⁽³¹⁸⁾ FTQAGSEVSALLGR ⁽³³¹⁾	89	718.2879	2
				⁽³¹⁸⁾ FTQAGSEVSALLGR ⁽³³¹⁾	93	718.2971	2
				⁽³¹⁸⁾ FTQAGSEVSALLGR ⁽³³¹⁾	93	718.7889	2
				⁽⁴¹⁴⁾ IMDPNIVGAEHYDVAR ⁽⁴²⁹⁾	44	605.8995	3
				⁽⁴⁷⁰⁾ FLSQPFQVAEVFTGHLGK ⁽⁴⁸⁷⁾	36	668.9542	3
⁽⁴⁷⁰⁾ FLSQPFQVAEVFTGHLGK ⁽⁴⁸⁷⁾	43	668.9856	3				
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	831326419	545	27	⁽⁸⁵⁾ LVLEVAQHLGENTVR ⁽⁹⁹⁾	49	559.9747	3
				⁽¹⁰⁰⁾ TIAMDGTEGLVR ⁽¹¹¹⁾	52	639.8192	2
				⁽¹¹⁵⁾ VNDTGAPIR ⁽¹²³⁾	49	471.2725	2
				⁽¹²⁴⁾ IPVGPETLGR ⁽¹³³⁾	53	519.7957	2
				⁽¹³⁴⁾ IMNVIGEPIDER ⁽¹⁴⁵⁾	64	701.3529	2
				⁽¹⁷⁹⁾ VVDLLAPYAK ⁽¹⁸⁸⁾	38	544.8176	2
				⁽¹⁹²⁾ IGLFGGAGVGK ⁽²⁰²⁾	50	488.2804	2
				⁽²³²⁾ EGNDLYHEMIESGVINLK ⁽²⁴⁹⁾	23	692.9946	3
				⁽²⁵⁵⁾ VALVYGQMNEPPGAR ⁽²⁶⁹⁾	65	809.4047	2
				⁽³⁰¹⁾ FTQAGSEVSALLGR ⁽³¹⁴⁾	82	718.3770	2
				⁽³⁰¹⁾ FTQAGSEVSALLGR ⁽³¹⁴⁾	82	718.8723	2
				⁽³⁷⁸⁾ AIAELGIYPAVDPLDSTSR ⁽³⁹⁶⁾	22	994.5229	2

Beta-3 tubulin	5923887	312	16	(63)AVLVLDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	50	809.4102	2
				(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	28	539.2661	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7973	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	48	565.7977	2
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	47	566.2913	2
				(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	84	580.3175	2
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	24	731.8457	2
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	24	732.3424	2
				(363)MSATFIGNSTAIQEIFK ⁽³⁷⁹⁾	30	929.4747	2
				Glutamate dehydrogenase, mitochondrial	DHE3_CHAAC	44	3
(109)ALASLMTYK ⁽¹¹⁷⁾	26	507.2753	2				
Tubulin alpha chain, testis-specific	TBAT_ONCMY	256	26	(85)QLFHPEQLITGK ⁽⁹⁶⁾	25	470.9217	3
				(85)QLFHPEQLITGK ⁽⁹⁶⁾	56	705.8877	2
				(97)EDAANNYAR ⁽¹⁰⁵⁾	58	512.2247	2
				(106)GHYTIGK ⁽¹¹²⁾	12	388.1998	2
				(157)LSVDYGK ⁽¹⁶³⁾	26	391.2016	2
				(157)LSVDYGKK ⁽¹⁶⁴⁾	27	455.2551	2
				(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	85	573.6244	3
				(216)NLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	74	859.9428	2
				(244)FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR ⁽²⁶⁴⁾	23	1205.1128	2
				(265)IHFPLVITYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	12	892.9840	2
(340)TIQFVDWCPTGFK ⁽³⁵²⁾	11	799.8857	2				
(353)VGINYQPPTVPPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	24	912.9971	2				
Tubulin alpha-1B chain-like	1041092531	161	10	(64)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁸⁾	32	851.3828	2
				(215)DLDIERPTYTNLNR ⁽²²⁸⁾	86	573.5760	3
				(264)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁷⁹⁾	43	586.2275	3
				(264)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁷⁹⁾	27	878.8943	2
				(264)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁷⁹⁾	27	879.3494	2
				(264)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁷⁹⁾	43	586.6008	3

Tubulin alpha-1B chain-like	1041092531	254	13	(64)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁸⁾	78	851.4543	2
				(64)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁸⁾	85	851.4543	2
				(64)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁸⁾	88	851.4545	2
				(215)DLDIRPTYTNLNR ⁽²²⁸⁾	79	573.6285	3
				(264)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁷⁹⁾	42	586.3166	3
				(394)FDLMYAK ⁽⁴⁰⁰⁾	22	452.2133	2
				(422)EDMAALEK ⁽⁴²⁹⁾	22	461.7107	2
Tubulin alpha-1C chain-like	657560129	106	10	(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	42	586.3166	3
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	29	912.9954	2
				(395)FNLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	13	452.2133	2
				(423)EDMAALEK ⁽⁴³⁰⁾	22	461.7107	2
Tubulin alpha-1D chain-like	1025292011	168	12	(157)LSVDYGK ⁽¹⁶³⁾	15	391.1561	2
				(157)LSVDYGKK ⁽¹⁶⁴⁾	29	455.1868	2
				(216)NLNIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	61	573.5760	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	43	586.2275	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	27	878.8943	2
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	27	879.3494	2
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	43	586.6008	3
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	22	912.9152	2
Tubulin alpha-1D chain-like	1025292011	181	14	(216)NLNIERPTYTNLNR ⁽²²⁹⁾	65	573.6285	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	42	586.3166	3
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	29	912.9954	2
				(395)FDLMYAK ⁽⁴⁰¹⁾	22	452.2133	2
				(423)EDMAALEK ⁽⁴³⁰⁾	22	461.7107	2

Tubulin beta chain-like isoform X1	617423779	545	18	(158)IREEYPDR ⁽¹⁶⁵⁾	28	539.2661	2
				(245)FPGQLNADLR ⁽²⁵⁴⁾	98	565.7973	2
				(245)FPGQLNADLR ⁽²⁵⁴⁾	48	565.7977	2
				(245)FPGQLNADLR ⁽²⁵⁴⁾	47	566.2913	2
				(256)LAVNMVPPFR ⁽²⁶⁵⁾	84	580.3175	2
				(266)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁹⁾	49	546.2728	3
				(313)YLTVAEIFR ⁽³²¹⁾	53	527.3051	2
				(328)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁹⁾	24	731.8457	2
				(328)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁹⁾	24	732.3424	2
				(354)TAVCDIPPR ⁽³⁶²⁾	53	514.7617	2
				(384)LSEQFTAMFR ⁽³⁹³⁾	56	623.2966	2
				Tubulin beta-1 chain	TBB1_GADMO	1003	33
(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	65	809.4080	2				
(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	58	809.4114	2				
(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	49	539.2648	2				
(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	84	668.3455	2				
(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	64	668.3456	2				
(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	64	668.8396	2				
(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7910	2				
(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	93	565.7991	2				
(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	14	572.2120	2				
(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	65	580.3090	2				
(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	64	580.3092	2				
(253)LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	64	580.8074	2				
(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	580.8074	3				
(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	64	818.9166	2				
(298)NMMAACDPR ⁽³⁰⁶⁾	13	549.2221	2				
(310)YLTVAEIFR ⁽³¹⁸⁾	58	527.3021	2				
(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	57	731.8443	2				
(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	35	731.8448	2				

Tubulin beta-2 chain	318037303	417	23	(63)AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	50	809.4102	2
				(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	28	539.2661	2
				(253)LAVNMVPFPR ⁽²⁶²⁾	84	580.3175	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	546.2728	3
				(310)YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	53	527.3051	2
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	24	731.8457	2
				(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	24	732.3424	2
				(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	53	514.7617	2
				(363)MSATFVGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	21	930.4734	2
				(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	56	623.2966	2
				Tubulin beta-4B chain	734615370	613	31
(155)IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	28	539.2661	2				
(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	69	668.3480	2				
(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7973	2				
(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	48	565.7977	2				
(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	47	566.2913	2				
(253)LAVNMVPFPR ⁽²⁶²⁾	84	580.3175	2				
(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	546.2728	3				
(283)SLTVPELTQQMFDSK ⁽²⁹⁷⁾	13	862.4320	2				
(310)YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	53	527.3051	2				
(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	24	731.8457	2				
(325)EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	24	732.3424	2				
(351)TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	53	514.7617	2				
(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	35	929.4747	2				
(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	15	929.4764	2				
(363)MAATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	15	929.9786	2				
(381)ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	56	623.2966	2				
Tubulin beta-4B chain-like	928081090	106	11	(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	61	668.2954	2
				(242)FPGQPNDLSR ⁽²⁵¹⁾	33	565.7401	2
				(253)LAVNMVPYPR ⁽²⁶²⁾	13	580.2552	2

Tubulin beta-4B chain-like isoform X2	551498305	594	28	⁽⁶³⁾ AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	50	809.4102	2				
				⁽¹⁵⁵⁾ IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	28	539.2661	2				
				⁽¹⁶³⁾ IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	69	668.3480	2				
				⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7973	2				
				⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	48	565.7977	2				
				⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	47	566.2913	2				
				⁽²⁵³⁾ LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	84	580.3175	2				
				⁽²⁶³⁾ LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	49	546.2728	3				
				⁽³¹⁰⁾ YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	53	527.3051	2				
				⁽³²⁵⁾ EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	24	731.8457	2				
				⁽³²⁵⁾ EVDEQMLNVQNK ⁽³³⁶⁾	24	732.3424	2				
				⁽³⁵¹⁾ TAVCDIPPR ⁽³⁵⁹⁾	53	514.7617	2				
				⁽³⁶³⁾ MSATFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	30	929.4747	2				
⁽³⁸¹⁾ ISEQFTAMFR ⁽³⁹⁰⁾	56	623.2966	2								
Tubulin beta-5 chain	929316567	283	12	⁽⁶³⁾ AVLVDLEPGTMDSVR ⁽⁷⁷⁾	50	809.4102	2				
				⁽¹⁵⁵⁾ IREEYPDR ⁽¹⁶²⁾	28	539.2661	2				
				⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	98	565.7973	2				
				⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	48	565.7977	2				
				⁽²⁴²⁾ FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	47	566.2913	2				
				⁽²⁵³⁾ LAVNMVPPFR ⁽²⁶²⁾	84	580.3175	2				
				⁽³⁶³⁾ MASTFIGNSTAIQELFK ⁽³⁷⁹⁾	23	929.4747	2				
				⁽⁶⁵⁾ AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	46	851.3315	2				
⁽¹¹³⁾ ELIDLVLDR ⁽¹²¹⁾	45	543.2479	2								
11 Alpha-tubulin	2599500	91	5	⁽¹⁰⁰⁾ TIAMDGTEGLVR ⁽¹¹¹⁾	73	639.8190	2				
				⁽¹¹⁵⁾ VLDTGAPIR ⁽¹²³⁾	65	471.2719	2				
				⁽¹²⁴⁾ IPVGPETLGR ⁽¹³³⁾	51	519.7959	2				
				⁽¹³⁴⁾ IMNVIGEPIDER ⁽¹⁴⁵⁾	64	701.3536	2				
				⁽¹⁷⁹⁾ VVDLLAPYAK ⁽¹⁸⁸⁾	40	544.8179	2				
				⁽¹⁷⁹⁾ VVDLLAPYAK ⁽¹⁸⁸⁾	6	544.8193	2				
				⁽¹⁹²⁾ IGLFGGAGVGK ⁽²⁰²⁾	45	488.2804	2				
				⁽³⁰¹⁾ FTQAGSEVSALLGR ⁽³¹⁴⁾	89	718.3767	2				
				⁽³¹⁰⁾ YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	32	527.3049	2				
				ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_CYPCA	308	15	⁽¹⁰⁰⁾ TIAMDGTEGLVR ⁽¹¹¹⁾	73	639.8190	2
								⁽¹¹⁵⁾ VLDTGAPIR ⁽¹²³⁾	65	471.2719	2
⁽¹²⁴⁾ IPVGPETLGR ⁽¹³³⁾	51	519.7959	2								
⁽¹³⁴⁾ IMNVIGEPIDER ⁽¹⁴⁵⁾	64	701.3536	2								
⁽¹⁷⁹⁾ VVDLLAPYAK ⁽¹⁸⁸⁾	40	544.8179	2								
⁽¹⁷⁹⁾ VVDLLAPYAK ⁽¹⁸⁸⁾	6	544.8193	2								
⁽¹⁹²⁾ IGLFGGAGVGK ⁽²⁰²⁾	45	488.2804	2								
⁽³⁰¹⁾ FTQAGSEVSALLGR ⁽³¹⁴⁾	89	718.3767	2								
⁽³¹⁰⁾ YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	32	527.3049	2								
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	TBB_PSEAM	32	2					⁽³¹⁰⁾ YLTVA AIFR ⁽³¹⁸⁾	32	527.3049	2

DNA helicase MCM9	657580865	56	1	(193)LTVGSIPR ⁽²⁰⁰⁾	31	421.7030	2
				(557)LAEAHC ⁽⁵⁶³⁾	26	428.7300	2
Flotillin-1	808879681	374	27	(41)ITLNTLTLNVK ⁽⁵¹⁾	44	615.3023	2
				(134)VASSDLVNMGIGVVS ⁽¹⁵²⁾ YTLK ⁽¹⁵²⁾	33	656.9369	3
				(153)DVHDDQDY ⁽¹⁶⁶⁾ LHSLGK ⁽¹⁶⁶⁾	21	547.8449	3
				(221)AAVDVEVNTK ⁽²³⁰⁾	44	555.2108	2
				(231)KAES ⁽²⁴⁴⁾ EMAYQLQVAK ⁽²⁴⁴⁾	25	537.8792	3
				(254)MQVQVVER ⁽²⁶¹⁾	36	502.7041	2
				(262)TQQITLQEQEIR ⁽²⁷⁴⁾	43	800.3068	2
				(262)TQQITLQEQEIR ⁽²⁷⁴⁾	43	800.3803	2
				(303)LQLIMEAEAEAESIR ⁽³¹⁷⁾	88	859.8060	2
				(303)LQLIMEAEAEAESIR ⁽³¹⁷⁾	88	859.8654	2
				(393)LAGEVLEIMTR ⁽⁴⁰³⁾	43	624.2611	2
				Flotillin-1 isoform X1	657804113	166	13
(221)DVHDDQDY ⁽²³⁰⁾ LHSLGK ⁽²³⁰⁾	44	555.2108	2				
(231)KAES ⁽²⁴⁴⁾ EMAYQLQVAK ⁽²⁴⁴⁾	25	537.8792	3				
(254)MQVQVVER ⁽²⁶¹⁾	36	502.7041	2				
(350)DGAMVDM ⁽³⁶⁰⁾ LLEK ⁽³⁶⁰⁾	44	627.2212	2				
(350)DGAMVDM ⁽³⁶⁰⁾ LLEK ⁽³⁶⁰⁾	10	627.2212	2				
Reggie protein 2b	148839374	231	19	(134)VASSDLVNMGIGVVS ⁽¹⁵²⁾ YTLK ⁽¹⁵²⁾	33	656.9369	3
				(153)DVHDDQDY ⁽¹⁶⁶⁾ LHSLGK ⁽¹⁶⁶⁾	21	547.8449	3
				(231)KAES ⁽²⁴⁴⁾ EMAYQLQVAK ⁽²⁴⁴⁾	25	537.8792	3
				(262)AQQIMLQEQEIR ⁽²⁷⁴⁾	21	800.3068	2
				(262)AQQIMLQEQEIR ⁽²⁷⁴⁾	21	800.3803	2
				(303)LQLIMEAEAEAESIR ⁽³¹⁷⁾	88	859.8060	2
				(303)LQLIMEAEAEAESIR ⁽³¹⁷⁾	88	859.8654	2
				(350)DGAMVDM ⁽³⁶⁰⁾ LLEK ⁽³⁶⁰⁾	44	627.2212	2
(350)DGAMVDM ⁽³⁶⁰⁾ LLEK ⁽³⁶⁰⁾	10	627.2212	2				
Sperm-associated antigen 6	317419828	71	2	(471)YYSPGYSEVLLER ⁽⁴⁸³⁾	71	788.3051	2
Tubulin alpha chain	TBA_ONCKE	31	2	(113)EIIDIVLDR ⁽¹²¹⁾	31	543.3121	2
12 Alpha-enolase isoform X1	736300793	53	2	(270)YITPDQLADIYR ⁽²⁸¹⁾	53	734.3751	2

Alpha-tubulin	2599500	83	8	(65)AVFVDLEPTVIDEVR ⁽⁷⁹⁾	30	851.4555	2
				(113)ELIDLVLDR ⁽¹²¹⁾	34	543.3059	2
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	19	586.3302	3
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	19	586.6554	3
Beta-2 tubulin	5923889	86	8	(163)IMNTFSVVPSPK ⁽¹⁷⁴⁾	17	668.3503	2
				(253)LA VNMVPFPR ⁽²⁶²⁾	49	580.3167	2
				(263)LHFFMPGFAPLTSR ⁽²⁷⁶⁾	19	546.2793	3
Elastase	379317093	53	6	(80)LSSPVTLN DK ⁽⁸⁹⁾	55	537.2814	2
Enolase A	98979415	53	2	(270)YITPDQLADLYR ⁽²⁸¹⁾	53	734.3751	2
Enolase A	98979415	69	2	(270)YITPDQLADLYR ⁽²⁸¹⁾	69	734.3766	2
Flotillin-1	808879681	267	21	(92)SEGEIAQIALETLEGHQR ⁽¹⁰⁹⁾	22	660.9959	3
				(221)AA YDVEVNTK ⁽²³⁰⁾	21	554.7669	2
				(221)AA YDVEVNTK ⁽²³⁰⁾	21	555.2683	2
				(254)MQVQVVER ⁽²⁶¹⁾	31	502.7604	2
				(254)MQVQVVER ⁽²⁶¹⁾	42	503.2606	2
				(262)TQQITLQE QEIR ⁽²⁷⁴⁾	39	800.4377	2
				(303)LQLIMEAEAEAESIR ⁽³¹⁷⁾	59	859.9326	2
				(378)VTMVSSGGSEVGAAK ⁽³⁹²⁾	37	698.3427	2
				(393)LAGEVLEIMTR ⁽⁴⁰³⁾	48	624.3333	2
				Flotillin-1	808879681	304	17
(221)AA YDVEVNTK ⁽²³⁰⁾	41	555.2717	2				
(254)MQVQVVER ⁽²⁶¹⁾	36	502.7607	2				
(303)LQLIMEAEAEAESIR ⁽³¹⁷⁾	48	859.9338	2				
(378)VTMVSSGGSEVGAAK ⁽³⁹²⁾	51	698.3431	2				
(393)LAGEVLEIMTR ⁽⁴⁰³⁾	29	624.3334	2				
(393)LAGEVLEIMTR ⁽⁴⁰³⁾	47	624.3386	2				
(404)LPSAVEK ⁽⁴¹⁰⁾	25	372.2148	2				

Flotillin-2	734634352	355	20	(45)LTLEIMTLQPR ⁽⁵⁵⁾	63	665.8710	2
				(113)SILGTLTVEQIYQDR ⁽¹²⁷⁾	26	868.4670	2
				(136)EVAAPDVGR ⁽¹⁴⁴⁾	41	457.2368	2
				(178)DADIGVAEAER ⁽¹⁸⁸⁾	57	573.2704	2
				(224)ASFNQEVNTK ⁽²³³⁾	38	569.2763	2
				(288)RPAEAEAYK ⁽²⁹⁶⁾	19	517.7648	2
				(288)RPAEAEAYK ⁽²⁹⁶⁾	20	517.7649	2
				(357)TALVLEALPK ⁽³⁶⁶⁾	45	527.8253	2
				(378)TNEIVILSGEGSR ⁽³⁹⁰⁾	69	687.8641	2
Flotillin-2 isoform X1	734614543	221	12	(178)DADIGVAEAER ⁽¹⁸⁸⁾	57	573.2704	2
				(224)ASFNQEVNTK ⁽²³³⁾	38	569.2763	2
				(288)RPAEAEAYK ⁽²⁹⁶⁾	19	517.7648	2
				(288)RPAEAEAYK ⁽²⁹⁶⁾	20	517.7649	2
				(357)TALVLEALPK ⁽³⁶⁶⁾	45	527.8253	2
				(378)TDEIVILSGEGSR ⁽³⁹⁰⁾	63	687.8641	2
GDP dissociation inhibitor 2	37362224	54	3	(90)MLLITQVTR ⁽⁹⁸⁾	29	545.8144	2
				(211)LYSESLAR ⁽²¹⁸⁾	25	469.7484	2
HSC70-interacting protein isoform X1	542178228	126	12	(138)ALDLFTEAIK ⁽¹⁴⁷⁾	23	560.3236	2
				(138)ALDLFTEAIK ⁽¹⁴⁷⁾	24	560.8116	2
				(138)ALDLFTEAIK ⁽¹⁴⁷⁾	28	560.8135	2
				(148)LNPCLGILYAK ⁽¹⁵⁸⁾	35	631.3500	2
				(160)ASVYIQMQKPNAAIR ⁽¹⁷⁴⁾	26	563.9707	3
				(160)ASVYIQMQKPNAAIR ⁽¹⁷⁴⁾	26	564.2998	3
				(199)LLGHWEEAAR ⁽²⁰⁸⁾	37	394.5329	3
(199)LLGHWEEAAR ⁽²⁰⁸⁾	33	591.3062	2				
Reggie protein 1-a	148839384	256	15	(101)AVVLQTLEGLR ⁽¹¹²⁾	50	445.9223	3
				(113)SILGTLTVEQIYQDR ⁽¹²⁷⁾	26	868.4670	2
				(136)EVAAPDVGR ⁽¹⁴⁴⁾	41	457.2368	2
				(178)DADIGVAEAER ⁽¹⁸⁸⁾	57	573.2704	2
				(224)ASFNQEVNTK ⁽²³³⁾	38	569.2763	2
				(357)TALVLEALPK ⁽³⁶⁶⁾	45	527.8253	2
Reggie protein 2a	148839320	79	7	(92)SEGEIAQIALETLEGHQR ⁽¹⁰⁹⁾	22	660.9959	3
				(303)LKLIMEAEAEASIR ⁽³¹⁷⁾	59	859.9326	2

	Sperm-associated antigen 6	317419828	97	2	(169)IAASTLSDISK ⁽¹⁷⁹⁾	97	553.3096	2
13	Argininosuccinate synthase	807197111	112	9	(147)IPEFYNR ⁽¹⁵³⁾	33	469.7432	2
					(167)HGIPVPVTPR ⁽¹⁷⁶⁾	25	536.3013	2
					(167)HGIPVPVTPR ⁽¹⁷⁶⁾	25	536.8102	2
					(280)GIYETPGGTILLK ⁽²⁹²⁾	18	681.3868	2
					(356)GQVYILGR ⁽³⁶³⁾	36	453.2539	2
	Elongation factor 1-gamma	658871285	94	7	(18)AQIAAQYSGAR ⁽²⁸⁾	17	568.2906	2
					(31)VASNPPAFTFGQTNR ⁽⁴⁵⁾	50	803.9019	2
					(150)TFLVGER ⁽¹⁵⁶⁾	26	411.2236	2
	Flotillin-2	FLOT2_CARAU	94	13	(101)AVVLQTLEGLHR ⁽¹¹²⁾	46	445.9244	3
					(136)EVAAPDVGR ⁽¹⁴⁴⁾	40	457.2374	2
					(161)LDYLSSLGK ⁽¹⁶⁹⁾	30	498.2711	2
					(288)RPAEAEAYK ⁽²⁹⁶⁾	8	517.7637	2
					(288)RPAEAEAYK ⁽²⁹⁶⁾	32	517.7647	2
					(336)AEAESMR ⁽³⁴²⁾	6	404.6917	2
	Flotillin-2 isoform X1	734614543	95	7	(224)ASFNQEVNTR ⁽²³³⁾	31	569.2755	2
					(357)TALVLEALPK ⁽³⁶⁶⁾	37	527.8270	2
					(378)TDEIVILSGEGSR ⁽³⁹⁰⁾	30	687.8643	2
	Flotillin-2-like	584030019	116	7	(308)VLIQAQAEAEK ⁽³¹⁷⁾	40	536.3052	2
					(356)TALVLEALPK ⁽³⁶⁵⁾	37	527.8270	2
					(377)TNEIVILSGEGSR ⁽³⁸⁹⁾	40	687.8643	2
	GDP dissociation inhibitor 2	37362224	55	3	(90)MLLITQVTR ⁽⁹⁸⁾	26	545.8162	2
					(211)LYSESLAR ⁽²¹⁸⁾	29	469.7488	2
	HSC70-interacting protein	499050047	70	9	(138)ALDLFTEAIK ⁽¹⁴⁷⁾	16	560.8117	2
					(138)ALDLFTEAIK ⁽¹⁴⁷⁾	23	560.8124	2
					(160)ASVYIQMQKPNAAIR ⁽¹⁷⁴⁾	15	563.9661	3
					(160)ASVYIQMQKPNAAIR ⁽¹⁷⁴⁾	15	564.2959	3
					(199)LLGHWEEAAR ⁽²⁰⁸⁾	32	591.3055	2
	Neuronal-specific septin-3	734621879	138	7	(144)STLVNTLFR ⁽¹⁵²⁾	51	511.7937	2
					(265)LSHSVNIIPVLAK ⁽²⁷⁷⁾	36	464.2798	3
					(278)ADTMTIEER ⁽²⁸⁶⁾	51	541.2428	2

	Neuronal-specific septin-3	SEPT3_DANRE	35	4	(87)STLVNTLFK ⁽⁹⁵⁾ (318)SHLQDLK ⁽³²⁴⁾	35	511.7936	2
						7	420.7265	2
	Neuronal-specific septin-3 isoform X2	657523973	88	5	(262)LSHSVNIPVIAK ⁽²⁷⁴⁾ (275)ADTMTIEER ⁽²⁸³⁾	36	464.2798	3
						51	541.2428	2
	Septin-12	831301151	74	5	(59)STLVNTLFK ⁽⁶⁷⁾ (193)ADTLTMEER ⁽²⁰¹⁾	51	511.7937	2
						23	541.2428	2
14	Argininosuccinate synthase	ASSY_DANRE	80	7	(57)KVFIEDLR ⁽⁶⁴⁾ (58)VFIEDLR ⁽⁶⁴⁾ (146)IPEFYNR ⁽¹⁵²⁾ (265)IDIVENR ⁽²⁷¹⁾ (355)GQVYILGR ⁽³⁶²⁾	19	510.2966	2
						35	446.2472	2
						38	469.7448	2
						46	429.7342	2
						34	453.2562	2
	Elongation factor 1-gamma	EF1G_CARAU	58	5	(18)AQIAAQYSGAR ⁽²⁸⁾ (150)TFLVGER ⁽¹⁵⁶⁾ (213)MAQFDAK ⁽²¹⁹⁾	51	568.2932	2
						29	411.2256	2
						3	413.6877	2
	Elongator complex protein 5	ELP5_DANRE	28	4	(251)VALPFVFSQEKK ⁽²⁶²⁾	28	696.3483	2
15	Citrate synthase, mitochondrial	CISY_KATPE	93	11	(80)GLVYETSVLDPEEGIR ⁽⁹⁵⁾ (321)EMGGEVSDER ⁽³³⁰⁾ (370)HLPNDPMFK ⁽³⁷⁸⁾ (386)IVPNVLEQK ⁽³⁹⁶⁾ (444)ALGFPLERPK ⁽⁴⁵³⁾	53	888.9536	2
						50	562.7320	2
						16	557.7697	2
						44	605.3607	2
						14	564.3320	2
	Citrate synthase, mitochondrial	CISY_KATPE	34	2	(321)EMGGEVSDER ⁽³³⁰⁾	34	562.7285	2
	Creatine kinase, testis isozyme	KCRT_ONCMY	28	1	(361)LLVEMEK ⁽³⁶⁷⁾	28	439.2367	2
	Kinesin-like protein KIF22	KIF22_DANRE	29	1	(438)KEIQMLK ⁽⁴⁴⁴⁾	29	453.7231	2

16	Creatine kinase B-type	765158572	662	28	(87)ELLDPVIEDR ⁽⁹⁶⁾	64	599.8131	2
					(87)ELLDPVIEDR ⁽⁹⁶⁾	65	599.8145	2
					(117)GGDDLDPNYVLSSR ⁽¹³⁰⁾	78	754.3558	2
					(178)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²⁰⁹⁾	46	908.9413	4
					(178)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²⁰⁹⁾	126	908.9436	4
					(178)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²⁰⁹⁾	109	908.9444	4
					(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾	53	553.2754	3
					(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾	80	829.4221	2
					(243)GGNMKEVFNR ⁽²⁵²⁾	50	389.8534	3
					(253)FCTGLTK ⁽²⁵⁹⁾	29	413.7015	2
					(320)RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	99	712.3486	3
					(321)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	106	989.9751	2
					(321)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	136	989.9783	2
						Creatine kinase B-type isoform X1	734634781	641
(93)ELLDPVIEDR ⁽¹⁰²⁾	65	599.8145	2					
(123)GGDDLDPNYVLSSR ⁽¹³⁶⁾	78	754.3558	2					
(184)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²¹⁵⁾	46	908.9413	4					
(184)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²¹⁵⁾	126	908.9436	4					
(184)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²¹⁵⁾	109	908.9444	4					
(230)TFLVWVNEEDHLR ⁽²⁴²⁾	53	553.2754	3					
(230)TFLVWVNEEDHLR ⁽²⁴²⁾	80	829.4221	2					
(259)FCTGLTK ⁽²⁶⁵⁾	29	413.7015	2					
(326)RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴⁷⁾	99	712.3486	3					
(327)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴⁷⁾	106	989.9751	2					
(327)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴⁷⁾	136	989.9783	2					
(365)LLVEMEK ⁽³⁷¹⁾	28	439.2239	2					

Creatine kinase B-type isoform X1	734634781	627	27	(93)ELLDPVIEDR ⁽¹⁰²⁾	57	599.2729	2				
				(93)ELLDPVIEDR ⁽¹⁰²⁾	64	599.8024	2				
				(93)ELLDPVIEDR ⁽¹⁰²⁾	57	599.8090	2				
				(123)GGDDLDPNYVLSSR ⁽¹³⁶⁾	78	754.3499	2				
				(123)GGDDLDPNYVLSSR ⁽¹³⁶⁾	69	754.3503	2				
				(184)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²¹⁵⁾	126	908.9439	3				
				(230)TFLVWVNEEDHLR ⁽²⁴²⁾	82	829.4213	2				
				(259)FCTGLTK ⁽²⁶⁵⁾	20	413.6956	2				
				(326)RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴⁷⁾	96	712.3469	3				
				(326)RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴⁷⁾	126	989.9750	2				
				(365)LLVEMEK ⁽³⁷¹⁾	35	439.2300	2				
				Creatine kinase B-type isoform X2	831560435	527	24	(117)GGDDLDPDYVLSSR ⁽¹³⁰⁾	28	754.3558	2
								(178)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²⁰⁹⁾	46	908.9413	4
(178)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²⁰⁹⁾	126	908.9436	4								
(178)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²⁰⁹⁾	109	908.9444	4								
(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾	53	553.2754	3								
(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾	80	829.4221	2								
(253)FCTGLTK ⁽²⁵⁹⁾	29	413.7015	2								
(320)RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	99	712.3486	3								
(321)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	106	989.9751	2								
(321)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	136	989.9783	2								
(359)LLVEMEK ⁽³⁶⁵⁾	28	439.2239	2								
Creatine kinase B-type isoform X2	831560435	545	24					(117)GGDDLDPDYVLSSR ⁽¹³⁰⁾	59	754.3499	2
								(117)GGDDLDPDYVLSSR ⁽¹³⁰⁾	36	754.3503	2
				(178)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMAR ⁽²⁰⁹⁾	126	908.9439	4				
				(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾	82	829.4213	2				
				(253)FCTGLTK ⁽²⁵⁹⁾	20	413.6956	2				
				(320)RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	96	712.3469	3				
				(321)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	126	989.9750	2				
				(359)LLVEMEK ⁽³⁶⁵⁾	35	439.2300	2				

Creatine kinase M-type-like	1025119948	156	11	(177)DMTDKEQEQLIADHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²⁰⁸⁾	39	908.9413	4
				(177)DMTDKEQEQLIADHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²⁰⁸⁾	69	908.9436	4
				(177)DMTDKEQEQLIADHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²⁰⁸⁾	70	908.9444	4
				(177)DMTDKEQEQLIADHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²⁰⁸⁾	29	912.9391	4
				(177)DMTDKEQEQLIADHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²⁰⁸⁾	17	912.9439	4
				(177)DMTDKEQEQLIADHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²⁰⁸⁾	77	912.9467	4
				(223)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁵⁾	53	553.2754	3
				(223)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁵⁾	80	829.4221	2
Creatine kinase M-type-like	1025119948	166	11	(177)DMTDKEQEQLIADHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²⁰⁸⁾	84	908.9439	4
				(177)DMTDKEQEQLIADHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²⁰⁸⁾	13	912.9466	4
				(223)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁵⁾	82	829.4213	2
Creatine kinase, testis isozyme	KCRT_ONCMY	283	23	(4)INDKMAK ⁽¹⁰⁾	4	417.7237	2
				(99)HGGYKPTDK ⁽¹⁰⁷⁾	26	501.7526	2
				(119)GGDDLDPNYVISSR ⁽¹³²⁾	92	754.3496	2
				(119)GGDDLDPNYVISSR ⁽¹³²⁾	78	754.3510	2
				(180)NMTDAEQQLIDDHFLFDKPVSPILLSAGMAR ⁽²¹¹⁾	74	908.9408	3
				(226)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁸⁾	64	553.2747	3
				(226)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁸⁾	54	829.4217	2
				(255)FCTGLTK ⁽²⁶¹⁾	12	413.6961	2
				(361)LLVEMEK ⁽³⁶⁷⁾	36	439.2375	2
				Creatine kinase, testis isozyme isoform X1	1020410399	430	16
(226)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁸⁾	80	829.4221	2				
(245)GGNMKEVFNR ⁽²⁵⁴⁾	50	389.8534	3				
(255)FCTGLTK ⁽²⁶¹⁾	29	413.7015	2				
(322)RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴³⁾	99	712.3486	3				
(323)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴³⁾	106	989.9751	2				
(323)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴³⁾	136	989.9783	2				
(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	28	651.2921	2				
(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	28	651.8182	2				
(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	37	651.8192	2				
(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	37	652.3103	2				

Creatine kinase, testis isozyme isoform X1	1020410399	360	14	(226)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁸⁾	82	829.4213	2
				(255)FCTGLTK ⁽²⁶¹⁾	20	413.6956	2
				(322)RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴³⁾	92	712.3469	3
				(323)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴³⁾	126	989.9750	2
				(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	38	651.2983	2
				(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	38	651.8090	2
17 Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial	657533569	60	6	(130)VLSGLCDIVLAR ⁽¹⁴¹⁾	16	658.3724	2
				(321)SLVFPEAENR ⁽³³⁰⁾	43	581.2946	2
	734631411	79	5	(49)DFSSEEIKR ⁽⁵⁷⁾	27	555.7741	2
				(319)SLVFPEAENR ⁽³²⁸⁾	54	581.3003	2
18 40S ribosomal protein S4 brain creatine kinase b	RS4_ICTPU	27	2	(234)AWVSIPR ⁽²⁴⁰⁾	27	414.2089	2
	27545193	256	17	(87)ELLDPVIEDR ⁽⁹⁶⁾	64	599.8167	2
				(87)ELLDPVIEDR ⁽⁹⁶⁾	65	599.8180	2
				(117)GGDDLDPNYVLSSR ⁽¹³⁰⁾	62	754.3560	2
				(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾	21	553.2756	3
				(321)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	72	989.9817	2
				(359)LLVEMEK ⁽³⁶⁵⁾	35	439.2349	2
creatine kinase B-type isoform X2	831560435	169	14	(117)GGDDLDPDYVLSSR ⁽¹³⁰⁾	40	754.3560	2
				(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾	21	553.2756	3
				(321)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴¹⁾	72	989.9817	2
				(359)LLVEMEK ⁽³⁶⁵⁾	35	439.2349	2
Creatine kinase, testis isozyme	225704742	119	8	(117)GGDDLDPNYVISSR ⁽¹³⁰⁾	62	754.3560	2
				(224)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁶⁾	21	553.2756	3
				(359)LLVEMEK ⁽³⁶⁵⁾	35	439.2349	2
creatine kinase, testis isozyme isoform X1	1020410399	196	13	(226)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁸⁾	41	553.2845	3
				(226)TFLVWVNEEDHLR ⁽²³⁸⁾	25	829.4258	2
				(255)FCTGLTK ⁽²⁶¹⁾	21	413.7039	2
				(323)GTGGVDTAAVGGVFDISNADR ⁽³⁴³⁾	86	989.9764	2
				(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	51	651.3030	2
				(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	51	651.8196	2
				(372)GQAVEDLMPAQK ⁽³⁸³⁾	48	652.3070	2

	DNA helicase MCM9	MCM9_DANRE	27	0	(215)LSVGSIPR ⁽²²²⁾	27	414.2089	2
	Major seminal plasma glycoprotein	PSP1_PIG	151	18	(34)LTDDYGTIFTYK ⁽⁴⁵⁾	87	718.8486	2
					(34)LTDDYGTIFTYK ⁽⁴⁵⁾	75	718.8489	2
					(77)EYVEILEGAPGSK ⁽⁸⁹⁾	50	696.3511	2
	Major seminal plasma glycoprotein PSPII	PSP2_PIG	64	8	(36)DTSGSISNTDR ⁽⁴⁶⁾	64	576.7556	2
	Protein spire homolog 2	SPIR2_DANRE	28	1	(148)HCGSNAAK ⁽¹⁵⁵⁾	28	423.2256	2
19	Extracellular matrix protein 2	ECM2_MOUSE	41	1	(481)KITMILR ⁽⁴⁸⁸⁾	41	494.2974	2
	Malate dehydrogenase	343459137	209	30	(12)VFGVTTLDIVR ⁽²²⁾	60	610.3550	2
					(23)ANAFVAELK ⁽³¹⁾	33	481.7668	2
					(76)IQEAGTEVVK ⁽⁸⁵⁾	48	537.2918	2
					(88)AGAGSATLSMAYAGAR ⁽¹⁰³⁾	29	735.8556	2
					(161)LVADAMDELK ⁽¹⁷⁰⁾	40	560.7803	2
	Malate dehydrogenase	197632449	164	14	(166)VFGVTTLDIVR ⁽¹⁷⁶⁾	60	610.3550	2
					(177)ANAFVAELK ⁽¹⁸⁵⁾	33	481.7668	2
					(216)VEFPADQLSALTAR ⁽²²⁹⁾	42	759.4015	2
					(216)VEFPADQLSALTAR ⁽²²⁹⁾	39	759.4033	2
					(242)AGAGSATLSMAYAGAR ⁽²⁵⁷⁾	29	735.8556	2
20	Cleft lip and palate transmembrane protein 1 homolog	CLPT1_DANRE	28	1	(375)NDIQFWNSR ⁽³⁸³⁾	28	590.3110	2
	Mitochondrial ATP synthase subunit gamma	323650056	54	7	(48)VYGTGALALYEK ⁽⁵⁹⁾	37	642.8458	2
					(72)HLLIGVTSDR ⁽⁸¹⁾	17	555.8112	2
	Phosphate carrier protein, mitochondrial	765159280	93	9	(99)SIGNGFAVTVR ⁽¹⁰⁹⁾	18	560.8096	2
					(99)SIGNGFAVTVR ⁽¹⁰⁹⁾	18	561.3023	2
					(187)IQTQPGYANTLR ⁽¹⁹⁸⁾	33	681.3561	2
					(216)GVVPLWMR ⁽²²³⁾	41	487.2695	2
	Phosphate carrier protein, mitochondrial isoform X1	736156395	74	5	(185)IQTQPGYANTLR ⁽¹⁹⁶⁾	33	681.3561	2
					(214)GVVPLWMR ⁽²²¹⁾	41	487.2695	2
	Radial spoke head 1 homolog	657581789	61	8	(16)LGEYEGGR ⁽²³⁾	38	440.7106	2
					(89)YEGSWVEDLR ⁽⁹⁸⁾	23	627.2872	2

21	14-3-3 protein beta/alpha-1	143B1_ONCMY	130	22	(19)YDDMAAAMK ⁽²⁷⁾	28	524.2068	2
					(42)NLLSVAYK ⁽⁴⁹⁾	29	454.2616	2
					(61)VISSIEQK ⁽⁶⁸⁾	30	452.2570	2
					(128)YLSEVASGDSK ⁽¹³⁸⁾	70	578.2785	2
					(159)DMQPTHPIR ⁽¹⁶⁷⁾	44	370.8473	3
					(213)DSTLIMQLLR ⁽²²²⁾	57	603.3297	2
GTP-binding nuclear protein Ran	RAN_CARAU	44	5	(12)LVLVGDGGTGK ⁽²²⁾	44	508.2852	2	
				(196)ALLEVVQSGGK ⁽²⁰⁶⁾	56	550.8148	2	
Proteasome subunit alpha type-7	PSA7_CARAU	59	7	(207)NIELAVIR ⁽²¹⁴⁾	28	464.2807	2	
Tubulin alpha chain	TBA_ONCKE	34	7	(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	34	586.3179	3	
				(265)IHFPLATYAPVISA EK ⁽²⁸⁰⁾	17	878.9966	2	
				(353)VGINYQPPTVVPGGDLAK ⁽³⁷⁰⁾	16	912.9977	2	
Tubulin beta chain	TBB_PSEAM	58	4	(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	24	565.2905	2	
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	24	565.8040	2	
				(242)FPGQLNADLR ⁽²⁵¹⁾	26	566.2966	2	
				(253)LAVNMVFPFR ⁽²⁶²⁾	58	580.3220	2	
22	Protein ABHD14A-like isoform X2	1020466340	57	6	(1)MMNFFRNR ⁽⁸⁾	28	574.2813	2
					(246)HACYMDKPR ⁽²⁵⁴⁾	29	597.8021	2
					(27)TAVAPIER ⁽³⁴⁾	63	428.7457	2
Solute carrier family 25 alpha, member 5	81157907	76	8	(192)AAYFGIYDTAK ⁽²⁰²⁾	15	610.2990	2	
Solute carrier family 25 alpha, member 5	81157907	109	14	(14)DFLAGGISA AISK ⁽²⁶⁾	20	625.3414	2	
				(27)TAVAPIER ⁽³⁴⁾	64	428.7460	2	
				(192)AAYFGIYDTAK ⁽²⁰²⁾	27	610.3012	2	
23	14-3-3 C2 protein	185134281	120	16	(19)YDDMAAAMK ⁽²⁷⁾	16	524.2104	2
					(28)EVTEQGGELSNEER ⁽⁴¹⁾	27	788.8753	2
					(42)NLLSVAYK ⁽⁴⁹⁾	27	454.2617	2
					(213)DSTLIMQLLR ⁽²²²⁾	49	603.3282	2

14-3-3 protein beta/alpha-1-like	734598825	251	24	(19)YDDMAAAMK ⁽²⁷⁾	32	524.2058	2
				(19)YDDMAAAMK ⁽²⁷⁾	30	524.2104	2
				(28)SVTEQGVLSNEER ⁽⁴¹⁾	71	788.8753	2
				(42)NLLSVAYK ⁽⁴⁹⁾	27	454.2617	2
				(61)VISSIEQK ⁽⁶⁸⁾	24	452.2557	2
				(128)YLSEVASGDAK ⁽¹³⁸⁾	49	570.2801	2
				(213)DSTLIMQLLR ⁽²²²⁾	49	603.3282	2
14-3-3 protein beta/alpha-A-like	831293865	135	16	(19)YDDMAAAMK ⁽²⁷⁾	32	524.2058	2
				(19)YDDMAAAMK ⁽²⁷⁾	30	524.2104	2
				(28)AVTEEGNELSNEER ⁽⁴¹⁾	27	788.8753	2
				(42)NLLSVAYK ⁽⁴⁹⁾	27	454.2617	2
				(213)DSTLIMQLLR ⁽²²²⁾	49	603.3282	2
14-3-3 protein beta/alpha-B	47085905	196	19	(19)YDDMAAAMK ⁽²⁷⁾	32	524.2058	2
				(19)YDDMAAAMK ⁽²⁷⁾	30	524.2104	2
				(42)NLLSVAYK ⁽⁴⁹⁾	27	454.2617	2
				(61)VISSIEQK ⁽⁶⁸⁾	24	452.2557	2
				(128)YLSEVASGDSK ⁽¹³⁸⁾	65	578.2776	2
				(213)DSTLIMQLLR ⁽²²²⁾	49	603.3282	2
14-3-3 protein zeta-like	657528212	100	10	(46)NLLSVAYK ⁽⁵³⁾	27	454.2617	2
				(65)VLSSIEQK ⁽⁷²⁾	68	452.2557	2
				(217)DSTLIMQLLR ⁽²²⁶⁾	49	603.3282	2
Adenylate kinase 1-2	222088001	117	12	(10)IIFVVGPGSGK ⁽²¹⁾	61	565.8299	2
				(156)ATEPVIAFYEGR ⁽¹⁶⁷⁾	66	676.8440	2
Glutathione S-transferase Mu 3	229366462	124	13	(70)IVQSNAIMR ⁽⁷⁸⁾	59	524.2824	2
				(97)VDLLENQSMDFR ⁽¹⁰⁸⁾	22	741.8434	2
				(136)QFSDFLGDR ⁽¹⁴⁴⁾	43	542.7521	2
				(136)QFSDFLGDR ⁽¹⁴⁴⁾	43	543.3162	2
Parkin coregulated gene protein	734600447	115	22	(35)ERPSKPTTFR ⁽⁴⁴⁾	29	406.8839	3
				(142)VLQHLVMSGDMVGESLVPYYR ⁽¹⁶²⁾	25	803.7350	3
				(163)QILPILNIFK ⁽¹⁷²⁾	16	599.8795	2
				(206)YGGEDAFINIK ⁽²¹⁶⁾	44	613.8079	2
				(206)YGGEDAFINIK ⁽²¹⁶⁾	44	614.3128	2

Proteasome subunit alpha type-7 A-1	575523593	158	13	(181)ALLEVVQSGGK ⁽¹⁹¹⁾	52	550.8175	2
				(192)NIELAVIR ⁽¹⁹⁹⁾	48	464.2815	2
				(211)EIETLVAEIEK ⁽²²¹⁾	58	637.3466	2
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptidlike	938059286	139	22	(24)YDDMASAMK ⁽³²⁾	16	524.2104	2
				(33)EVTEQGGELSNEER ⁽⁴⁶⁾	27	788.8753	2
				(47)NLLSVAYK ⁽⁵⁴⁾	27	454.2617	2
				(66)VISSIEQK ⁽⁷³⁾	24	452.2557	2
				(184)DSTLIMQLLR ⁽¹⁹³⁾	49	603.3282	2
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	734638733	114	10	(70)VAGDSEVYFLK ⁽⁸⁰⁾	40	613.8079	2
				(70)VAGDSEVYFLK ⁽⁸⁰⁾	40	614.3128	2
				(114)FLDETANMSADDR ⁽¹²⁶⁾	74	750.8205	2
25 Adenylate kinase 1-2	222088001	144	19	(10)IIFVVGGPGSGK ⁽²¹⁾	54	565.8312	2
				(32)YGYTHLSSGDLLR ⁽⁴⁴⁾	32	494.5790	3
				(156)ATEPVIAFYEGR ⁽¹⁶⁷⁾	58	676.8472	2
Glutathione S-transferase Mu 3	229366462	84	9	(70)IVQSNAIMR ⁽⁷⁸⁾	59	524.2806	2
				(97)VDLLENQSMDFR ⁽¹⁰⁸⁾	24	741.3680	2
				(97)VDLLENQSMDFR ⁽¹⁰⁸⁾	24	741.8435	2
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	734638733	88	5	(114)FLDETANMSADDR ⁽¹²⁶⁾	88	750.8170	2
26 Adenylate kinase isoenzyme 1	551517218	175	20	(10)IIFVVGGPGSGK ⁽²¹⁾	51	565.8306	2
				(89)GFLIDGYPR ⁽⁹⁷⁾	35	519.2701	2
				(149)RLDLYYK ⁽¹⁵⁵⁾	17	485.7685	2
				(156)ATEPVIAFYEGR ⁽¹⁶⁷⁾	71	676.8431	2
Adenylate kinase isoenzyme 1	551517218	135	17	(10)IIFVVGGPGSGK ⁽²¹⁾	56	565.8291	2
				(89)GFLIDGYPR ⁽⁹⁷⁾	23	518.7832	2
				(89)GFLIDGYPR ⁽⁹⁷⁾	23	519.2711	2
				(156)ATEPVIAFYEGR ⁽¹⁶⁷⁾	56	676.8454	2
Adenylate kinase isoenzyme 1	551517218	134	23	(10)IIFVVGGPGSGK ⁽²¹⁾	31	565.8321	2
				(10)IIFVVGGPGSGK ⁽²¹⁾	53	565.8326	2
				(32)YGYTHLSSGDLLR ⁽⁴⁴⁾	39	494.5800	3
				(89)GFLIDGYPR ⁽⁹⁷⁾	25	519.2731	2
				(156)ATEPVIAFYEGR ⁽¹⁶⁷⁾	18	676.8439	2

DNA helicase MCM9	657580865	56	1	⁽¹⁹³⁾ LTVGSIPR ⁽²⁰⁰⁾	32	421.7537	2
				⁽⁵⁵⁷⁾ LAEAHCR ⁽⁵⁶³⁾	26	428.7617	2
Parkin coregulated gene protein	734600447	81	14	⁽³⁵⁾ ERPSKPTTFR ⁽⁴⁴⁾	35	406.8834	3
				⁽¹¹³⁾ IQPVIPLIPIK ⁽¹²⁵⁾	20	736.4841	2
				⁽¹¹³⁾ IQPVIPLIPIK ⁽¹²⁵⁾	20	736.9711	2
				⁽²⁰⁶⁾ YGGEDAFINIK ⁽²¹⁶⁾	25	613.8057	2
Small fragment nuclease	37590357	59	8	⁽⁷⁰⁾ SGLTQAVR ⁽⁷⁷⁾	34	416.2323	2
				⁽¹³²⁾ IIDVSTIK ⁽¹³⁹⁾	25	444.7731	2
Translin	551502979	62	10	⁽²⁷⁾ VVQNLEQTAR ⁽³⁶⁾	30	578.8353	2
				⁽¹⁷⁰⁾ ISNFINELDSGFR ⁽¹⁸²⁾	32	756.3760	2
28 DNA helicase MCM9	657580865	56	1	⁽¹⁹³⁾ LTVGSIPR ⁽²⁰⁰⁾	32	421.7533	2
				⁽⁵⁵⁷⁾ LAEAHCR ⁽⁵⁶³⁾	26	428.7619	2
30 Nucleoside diphosphate kinase B-like	734627720	79	19	⁽⁸⁾ TFLAIKPDGVQR ⁽¹⁹⁾	38	672.4013	2
				⁽⁸⁾ TFLAIKPDGVQR ⁽¹⁹⁾	20	448.9186	3
				⁽⁸⁾ TFLAIKPDGVQR ⁽¹⁹⁾	38	672.8749	2
				⁽⁹⁰⁾ VMLGETNPADSKPGTIR ⁽¹⁰⁶⁾	41	601.3046	2

