



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

RAFAEL DE SOUSA FERREIRA

MORFOLOGIA, HISTOLOGIA E PROTEÔMICA DO TESTÍCULO DE CODORNAS
EUROPEIAS ALIMENTADAS COM ANACARDATO DE CÁLCIO

FORTALEZA

2019

RAFAEL DE SOUSA FERREIRA

MORFOLOGIA, HISTOLOGIA E PROTEÔMICA DO TESTÍCULO DE CODORNAS
EUROPEIAS ALIMENTADAS COM ANACARDATO DE CÁLCIO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Zootecnia. Área de concentração: Produção e melhoramento animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura
Coorientador: Dr. Fábio Roger Vasconcelos

FORTALEZA

2019

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

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

- F443m Ferreira, Rafael de Sousa.
Morfologia, histologia e proteômica do testículo de codornas europeias alimentadas com anacardato de cálcio / Rafael de Sousa Ferreira. – 2019.
67 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.
Coorientação: Prof. Dr. Fábio Roger Vasconcelos.
1. Coturnix coturnix coturnix. 2. Estresse oxidativo. 3. Reprodução. I. Título.

CDD 636.08

RAFAEL DE SOUSA FERREIRA

MORFOLOGIA, HISTOLOGIA E PROTEÔMICA DO TESTÍCULO DE CODORNAS
EUROPEIAS ALIMENTADAS COM ANACARDATO DE CÁLCIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Zootecnia. Área de concentração: Produção e melhoramento animal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Ednardo Rodrigues de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fagner de Patrocínio Vasconcelos
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Ao meus Pais, Ribamar e Fátima.

Minhas irmãs, Rayane e Rafaela.

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus por ter proporcionado tudo isso.

Ao meu pai que sempre me ajudou nesse período. Minha mãe que esteve ao meu lado cuidando dos meus animais. Minhas irmãs Rayane e Rafaela que sempre foram fundamentais na minha vida e que me ajudaram bastante.

Ao meu orientador Arlindo Moura, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ele e sua equipe.

Ao Dr. Fábio com quem aprendi bastante e fez de tudo para que isso acontecesse e também por toda ajuda e paciência durante esses dois anos.

Ao professor Ednardo por ter concedido os animais e a todos do setor de avicultura, em especial Cleane.

Ao professor Emílio por ter permitido a realização das análises histológicas e ao Kennedy que me ensinou bastante.

A minha querida amiga Nhaira que me fez companhia e me ajudou muito no experimento e na vida.

À Kamilla que sou eternamente grato por sua amizade e à Ylana e o Marcos que ajudaram bastante durante o experimento.

Aos meus amigos de residência que foram essenciais para meu crescimento como pessoa e profissional.

Ao Felipe Pessoa que foi alguém muito importante nessa fase.

Aos meus amigos Felipe Santo, Felipe Jackson, Nascimento, Milena por toda a diversão e descontração.

À Central Analítica da UFC e os seus técnicos

E aos meus colegas de mestrado e de laboratório.

À FUNCAP por ter me proporcionado a bolsa de mestrado.

“A ciência se compõe de erros, que, por sua vez,
são os passos até a verdade.”

Júlio Verne

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo avaliar a ação do anacardato de cálcio sobre as características morfológicas, histológicas e proteômica do testículo e epidídimo de machos reprodutores de codornas. Para isso, foram utilizados 22 machos com 140 dias de idade e distribuídos em quatro tratamentos, sendo T1 (6 animais), T2 (6 animais), T3 (5 animais) e T4 (5 animais) de modo que, com exceção do tratamento 1 (controle), em cada tratamento havia a adição de 0,25%; 0,50%; 0,75% de anacardato de cálcio, respectivamente, durante um período experimental de 210 dias. Para a obtenção dos dados morfométricos, os testículos foram pesados e medidos (comprimento, diâmetro e volume). O índice gonadossomático foi colhido a partir do peso da ave e o peso testicular. Para a análise proteômica dos testículos foram utilizando técnicas como extração das proteínas seguida da separação das proteínas por método 1D SDS-PAGE e utilizado a espectrometria de massas para identificação das bandas. Para a histologia os testículos e epidídimos foram colocados em tubos de 50 ml e fixados em solução de formaldeído a 10%. As amostras passaram por todo processamento histológico e, logo em seguida, foram cortadas a 0,6 µm com o auxílio de um micrometro e coradas para análise por microscopia óptica. Não se observou diferença significativa em nenhum dos dados morfométricos coletados. Utilizando a técnica de eletroforese SDS-PAGE 1D foram identificados um total de 35 bandas onde 13 bandas se mostraram diferentes das demais de modo que se observou uma diferença do tratamento com 0,75% de anacardato de cálcio do tratamento controle (T1). Um total de 152 proteínas foram identificadas onde somente 2% do total de proteínas possuem função antioxidante. O diâmetro do túbulo seminífero e a quantidade de células presentes no túbulo seminífero não sofreram influência do nível de anacardato de cálcio fornecido para as codornas, porém, foi observado diferença significativa entre as médias com relação à altura do epitélio seminífero e diâmetro do ducto epididimário. A partir das imagens histológicas, notou-se diferença com relação a estrutura histológica e presença de células nos tratamentos utilizados. A morfometria testicular das codornas não é alterada pelo valor de até 0,75% de anacardato e cálcio. A expressão de proteínas no testículo pode ser alterada pela adição de 0,75% de anacardato de cálcio, com destaque para proteínas relacionadas ao estresse oxidativo. A adição a partir de 0,50% de anacardato de cálcio modifica a altura do epitélio germinativo e o diâmetro do ducto epididimário, porém não resulta em efeitos no diâmetro do túbulo seminífero e nem na quantidade de células germinativas.

Palavras-chave: *Coturnix coturnix coturnix*. Estresse oxidativo. Reprodução.

ABSTRACT

The goal of this work was to assess the action of Calcium anacardate on morphological characteristics, histological and testicle proteomics and also epididymis of male breeding of quails. In this regard, 22 males aged 140 days were used and distributed in four treatments, T1 (6 animals), T2 (6 animals), T3 (5 animals) and T4 (5 animals) so that, with the exception of treatment 1 (control), in each treatment there was the addition of 0.25%; 0.50%; 0.75% calcium anacardate, respectively, during an experimental period of 210 days. In order to obtain morphometric data, the testicles were weighed and measured (length, diameter and volume). The gonadosomatic index was collected from the weight of the bird and the testicular weight. For the proteomic analysis of the testicles, techniques were used as protein extraction followed by separation of proteins by 1D SDS-PAGE method and used mass spectrometry to identify bands. About histology, the testicles and epididymis were placed in 50 ml tubes and fixed in a 10% formaldehyde solution. The samples underwent all histological processing and were then cut at 0.6 μm with the aid of a micrometer and stained for optical microscopy analysis. There was no significant difference in any of the morphometric data collected. Using the SDS-PAGE 1D electrophoresis technique, a total of 35 bands were identified where 13 bands were different from the others so that a difference in treatment was observed with 0.75% calcium anacardate control treatment (T1). A total of 152 proteins were identified where only 2% of total proteins have antioxidant function. The diameter of the seminiferous tubule and the amount of cells present in the seminiferous tubule were not influenced by the calcium anacardate level provided for quails, however, a significant difference was observed between the means in relation to the height of the seminiferous epithelium and diameter of the epididymal duct. From histological images, a difference was noted regarding histological structure and presence of cells in the treatments used. The testicular morphometry of quails is not altered by the value of up to 0.75% of anacardate and calcium. Protein expression in the testicle can be altered by the addition of 0.75% calcium anacardate, especially proteins related to oxidative stress. The addition from 0.50% calcium anacardate modifies the height of the germinal epithelium and the diameter of the epididymal duct, but does not result in effects on the diameter of the seminiferous tubule or the amount of germ cells.

Keywords: *Coturnix coturnix coturnix*. Oxidative stress. Reproduction

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Gel de poliacrilamida de proteínas do testículo de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) da linhagem europeia, com SDS-PAGE de 12,5% corado com azul de Coomassie..... 30
- Figura 2 – Perfil de intensidade das bandas de testículo de codornas alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio 31
- Figura 3 – Anotações da ontologia gênica do proteoma do testículo de codornas alimentadas com anacardato de cálcio em função do processo biológico (A), componente celular (B) e função molecular (C)..... 32
- Figura 4 – Redes de interação interproteica de proteínas: *Superóxido dismutase* [Cu – Zu] (SOD1); *Peroxidoxin-6* (PRDX6); *Stress-70 protein* (HSPA9); *60 kDa heat shock protein* (HSPD1) e *Heat shock cognate 71 kDa protein* (HSPA8) obtidas através do aplicativo STRING, mostrando interações no modo evidência. Linhas de cores diferentes representa os tipos de evidência para a associação. (-) *Text-mining*; (-) Experimentos; (-) Co-expressão; (-) Co-ocorrência; (-) *gene neighborhood*; (-) homologia..... 33
- Figura 5 – Análise *in silico* das redes de interação interproteica das proteínas que foram diferencialmente expressas no testículo de codornas europeia (*Coturnix coturnix coturnix*), obtidas com base no banco de dados STRING com o intuito de verificar interações com outras proteínas que possuem função antioxidante. (A) peroxiredoxin-6 (PRDX6), (B) superoxide dismutase [Cu-Zu] (SOD1), (C) Stress-70 protein, mitochondrial (HSPD1), (D) 60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPA9), (E) Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8). (-) *Text-mining*; (-) Experimentos; (-) Co-expressão; (-) Co-ocorrência; (-) *gene neighborhood*; (-) homologia 34
- Figura 6 – Microscopia óptica do túbulo seminífero de codornas europeias alimentadas com anacardato de cálcio 37
- Figura 7 – Microscopia óptica do epidídimo de codornas europeias alimentadas com anacardato de cálcio 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição percentual e nutricional calculada das rações experimentais utilizadas para codornas	25
Tabela 2 – Dados morfométricos do testículo e peso da ave de codornas europeias (Coturnix coturnix coturnix) alimentadas com diferentes níveis de ácido anacárdico (média±desvio-padrão).....	30
Tabela 3 – Proteínas do tecido testicular de codornas europeias. As proteínas foram separadas por eletroforese unidimensional (sds-page) e identificadas por espectrometria de massas (esi-q-tof) identificação das proteínas expressas no tecido testicular de codornas europeias alimentadas com diferentes níveis de ácido anacárdico	57
Tabela 4 – Valores médios dos parâmetros morfométricos do testículo e epidídimo de codornas europeias alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio	35
Tabela 5 – Quantidade de células presente no túbulo seminífero de testículos de codornas europeias alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comitê de ética do uso de animais
DDA	Aquisição Dependente de Dados
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Grama
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kDa	KiloDalton
LCC	Líquido da Castanha de Caju
mm	Milímetro
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamina
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFC	Universidade Federal do Ceará
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TBARS	Substância Reativa ao ácido tiobartúrico
µm	Micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- °C Celsius
- ® Marca registrada

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Codornas europeias	16
2.2	Testículo	17
2.3	Epidídimo.....	18
2.4	Antioxidantes.....	18
2.5	Uso de antioxidantes na alimentação animal	20
2.6	Anacardato de cálcio	21
3	INTRODUÇÃO	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Químicos	24
4.2	Modelo experimental	24
4.3	Histologia	26
4.3.1	<i>Microscopia óptica</i>	26
4.4	Proteômica	27
4.4.1	<i>Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) da proteína testicular</i>	27
4.4.2	<i>Identificação das proteínas) e pesquisa de dados</i>	27
4.4.3	<i>Ontologia gênica e interações proteicas</i>	28
4.5	Análise estatística	29
5	RESULTADOS	29
5.1	Dados morfométricos	29
5.2	Análise proteômica	30
5.3	Histologia	35
6	DISCURSSÃO	38
6.1	Dados morfométricos	38

6.2	Análise proteômica	40
6.3	Histologia	44
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO A – TABELA 3 – PROTEÍNAS DO TECIDO TESTÍCULAR DE CODORNAS EUROPEIAS. AS PROTEÍNAS FORAM SEPARADAS POR ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE) E IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ESI-Q- TOF) IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS NO TECIDO TESTICULAR DE CODORNAS EUROPEIAS ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ÁCIDO ANACÁRDICO	57

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A coturnicultura até a década de 80 era considerada uma atividade de subsistência. A partir de investimentos em seleção e qualidade dos produtos, os produtores começaram a ter interesse por essa cultura e visualizaram nela bons rendimentos. Assim, iniciaram-se os investimentos em novas tecnologias, melhores seleções de matrizes e aumento da produção de codornas no país (PASTORE *et al.*, 2012). Em 2013, por exemplo, houve um aumento de 10,6% no rebanho efetivo de codorna no país (IBGE, 2013). Esse aumento foi maior quando comparado ao ano de 2012 que foi de 5,6% (IBGE 2012). Esse crescimento foi relacionado a novos investimentos em tecnologia aplicadas a essa cultura, além de apresentar boas perspectivas para o futuro devido ao seu crescimento estável.

O crescimento da demanda por produtos oriundos da codorna está também atrelado pelo fato de ser uma excelente alternativa para a alimentação humana, podendo se utilizar da carne e ovos (SILVA; COSTA, 2009). Para que a produção de ovos e carnes tenha um aumento expressivo é preciso cuidados nutricionais, sanitários e reprodutivo para com os animais. Alguns fatores, como alta umidade relativa do ar, incidência de doenças, flutuações de temperatura ambiental, presença de micotoxinas, vacinações, contaminações por metais pesados e baixa qualidade da ração podem influenciar negativamente a produção, causando assim diminuição da produtividade (SURAI, 2006; WANG *et al.*, 2009). Fatores climáticos, por exemplo, podem interferir na produção dos animais, acarretando assim em um menor consumo de alimento, menor taxa de crescimento, aumentando a conversão alimentar e diminuindo a produtividade desses animais (ABREU *et al.*, 2003). A manipulação nutricional é um meio utilizado para diminuir esses efeitos negativos que a variável ambiente pode causar ao animal, desta forma, o uso de aditivos na alimentação das codornas mostra-se importante, pois, a partir da utilização de um determinado antioxidante é possível diminuir os efeitos causados por estresse oxidativo decorrente do desconforto térmico sobre os testículos e epidídimos de codornas (KUBO *et al.*, 2015; SURAI, 2006).

Com o objetivo de diminuir as ações negativas que o estresse oxidativo pode causar aos rendimentos dos animais, a suplementação com agentes antioxidantes se mostra eficaz, para diminuição de danos causados por agentes oxidativos (SURAI, 2006). Dentre esses antioxidantes o anacardato de cálcio apresenta eficaz capacidade de diminuir esses danos causados por agentes oxidantes (KUBO *et al.*, 2005). O anacardato de cálcio é um composto fenólico encontrado no cajueiro (*Anacardium occidentale L*) sua maior proporção é encontrada

na castanha de caju de onde é extraído o líquido da castanha de caju (LCC). Apresenta diversas funções biológicas como: antitumoral, antibacteriano e antioxidante (TREVISAN *et al.*, 2006). Como antioxidante, pode agir evitando a oxidação de compostos que possuem instauração na cadeia carbônica (BERTECHINE, 2012). Segundo Kubo *et al.* (2006), esse antioxidante evita com que íons metálicos de transição comecem o processo de oxidação, além de atuar na inativação nos intermediários desse processo e podem também inibir enzimas que auxiliam o processo oxidativo.

Pouco se conhece sobre os efeitos desse antioxidante sobre o trato reprodutivo de codornas e como eles podem agir sobre as proteínas do tecido testicular e sobre a morfologia testicular. Com isso, justifica-se a utilização desse agente antioxidante sobre a dieta de codornas para a observação de mudanças nos aspectos proteicos, morfológicos e histológicos do trato reprodutivo de codornas machos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Codornas europeias

A codorna doméstica foi introduzida no Brasil na década de cinquenta e a exploração nacional se destina quase que exclusivamente à produção de ovos (BATISTA, 2013). Três espécies de codornas estão disponíveis para a exploração no Brasil, sendo a japonesa e a americana com aptidão para ovos e a europeia com aptidão para carne de modo que a carne e os ovos de codorna são uma excelente fonte de proteínas de alto valor biológico (BARRETO *et al.*, 2007). A criação de codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) vem sendo difundida no país, sendo comumente utilizada como um animal de dupla aptidão (carne e ovos), principalmente por produtores de médio e pequeno porte. Se comparadas, as codornas europeias possuem um maior e mais rápido crescimento do que as codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) (FERREIRA *et al.*, 2012). Entretanto, segundo Pinto *et al.* (2003), a espécie japonesa possui uma maior eficiência de produção quando comparada a espécie europeia.

A codorna mostra-se uma excelente estratégia para a segurança e sustentabilidade alimentar de regiões sem muitos recursos naturais já que esses animais possuem uma produção de ovos de forma precoce, iniciando a postura aos 40 dias de idade diferentemente da galinha de postura que leva cerca de 120 dias para iniciar à postura (JORDÃO FILHO, 2008; SILVA, COSTA, 2009). Além disso, esses animais mostram rápido crescimento apresentando um pico máximo de crescimento aos 27 dias de idade, ocorrendo nesse período uma maior deposição de proteínas e água na carcaça (SILVA *et al.*, 2011). Esses animais atingem maturidade sexual em curto tempo (35 a 42 dias), a alta produtividade (média de 300/ano), necessidade de pequenos espaços para manter grandes populações (50 animais/1m²), a grande longevidade associada à alta produção (14 a 18 meses), pequeno investimento e, como consequência, o rápido retorno financeiro (PASTORE *et al.*, 2012).

Essas características têm atraído produtores e, com isso, o crescimento da produção de codorna no Brasil tem apresentado crescimentos significativo durante os anos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017) o rebanho efetivo de codorna no Brasil em 2017 foi de 15,5 milhões de cabeças, número esse menor ao já registrado no país em 2014 quando houve um total de 20,5 milhões de cabeças. Com relação a produção de ovos, em 2017 o país produziu cerca de 290,8 milhões de dúzias de ovos de codornas. Em 2011, o Brasil passou a ser o quinto maior produtor mundial de carne de codorna e o segundo maior produtor

mundial de ovos (IBGE, 2012).

2.2. Testículo

Os testículos são órgãos que apresentam funções exócrinas e endócrinas. A função exócrina está relacionada com a produção de espermatozoides no túbulo seminífero através do processo de espermatogênese. Como função endócrina os testículos são importantes na produção de testosterona por células intersticiais presentes no túbulo intersticial (AUGHEY; FRYE, 2001). Em codornas, assim como na maioria das espécies de aves, localizam-se na cavidade celomática (LAKE, 1981), craniais aos rins e fixados à parede dorsal interna por uma dobra do peritônio (FORMAN *et al.*, 2004). Segundo Froman *et al.* (2004), essa posição favorece as aves a realizarem a espermatogênese a uma temperatura corporal interna de 40° a 42°C, de forma que em mamíferos a espermatogênese é sensível a alta temperatura sendo realizada em uma temperatura abaixo de 4°C da temperatura corporal. De acordo com Santos *et al.* (2012), existe uma pequena diferença com relação a posição dos mesmos, sendo o testículo direito mais cranial que o esquerdo.

Os testículos são relativamente maiores com relação ao peso corporal em codornas se comparados a testículos de algumas espécies de mamíferos. Em codornas essa relação chega a 3,7% (LANNA *et al.*, 2013), de modo que em gatos a relação peso corporal/peso testicular é de 1,1% (FRAGOSO *et al.*, 2013). Com relação ao crescimento e desenvolvimento do testículo, as codornas apresentam desenvolvimento máximo dos testículos com 60 a 90 dias de idade (SANTOS *et al.*, 2012).

Morfologicamente, o testículo é coberto por duas camadas de túnicas varginais e uma camada de túnica albugínea que consiste em tecido conjuntivo denso. A túnica albugínea em contato com os septos testiculares (espátula testicular) dividem os testículos em cerca de 250 lobos, cada lóbulo testicular é ocupado por 1-4 túbulos seminíferos em forma de U, com extremidades duplas (KUEHNEL, 2003). Os túbulos seminíferos apresentam células de Sertoli e células intersticiais. As células de Sertoli são localizadas na região basal do epitélio de modo que circundam as células espermatogênicas adjacentes. Firmemente ligadas a outras células de suporte, elas criam uma barreira no sangue que protege as células espermatogênicas em desenvolvimento da influência do sangue (COOKSEY *et al.*, 1973). Os túbulos seminíferos apresentam um epitélio germinativo, com espermatogônias e células espermáticas em diferentes fases de desenvolvimento de modo que após a formação dos espermatozoides os mesmos irão para o epidídimo através da rede testis e logo em seguida pelo o ducto eferente. (GONZÁLES-MORÁN *et al.*, 2008; RAZI *et al.*, 2010).

2.3 Epidídimo

O epidídimo está localizado na borda dorsomedial do testículo (RAZI *et al.*, 2010), e tem uma grande importância no transporte e maturação dos espermatozoides, na secreção e reabsorção dos fluidos e na remoção de espermatozoides degenerados (LAKE, 1981). O epidídimo é constituído por um conjunto de ductos que formam a rede testicular, ductos eferentes proximais e distais, ductos de conexão e ducto epididimário que desemboca no ducto deferente (RAZI *et al.*, 2010).

Exclusivamente em codornas existe a formação de um plug celular entre a rede testicular e os ductos eferentes que funciona como uma válvula que controla o fluxo seminal através da rede testicular em direção aos ductos eferentes, impedindo seu retorno ao testículo. (ORSI *et al.*, 2007). O ducto do epidídimo de aves é muito curto de modo que não há a subdivisão do epidídimo em cabeça, corpo e cauda como nos mamíferos (GRAY, 1937), porém no lúmen epididimário, os espermatozoides sofrem outras ações como modificações no seu metabolismo e alterações na atividade flagelar (MANN; LUTWAK-MANN, 1981; COOPER *et al.*, 1986). Em aves, os espermatozoides aumentam sua capacidade de motilidade ao passar pelos ductos epididimário.

A região epididimária (estrutura composta de muitos ductos eferentes curtos que se juntam ao canal epididimário) é constituída por células epiteliais e células dos ductos eferentes. O ducto eferente possui em sua estrutura células ciliadas principais e não principais, e são fundamentais na absorção de fluídos, além de ser o local onde há a transição dos espermatozoides para o lúmen epididimário (BEDFORD, 1978; AIRE, 1989). Normalmente os espermatozoides permanecem 30 minutos no ducto eferente (CLULLOW; JONES, 1982).

2.4 Antioxidantes

Quando os animais sofrem o processo de estresse oxidação ocorre um declínio do balanço natural de pró-oxidantes e antioxidantes, deslocando-se mais para o lado oxidativo (SEIS, 1985). Com isso, ocorre um metabolismo aeróbico das células de modo a produzirem radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando assim em lesões nas células pela oxidação de importantes moléculas como proteínas, carboidratos, lipídios, além do DNA celular (SURAI, 2006; CONSTANTINI; MOLLER, 2009). Os antioxidantes possuem um importante papel contra os efeitos negativos decorrentes de radicais livre e EROs, sobre os

tecidos reprodutivos de aves agindo sobre o balanço pró-oxidantes e antioxidantes (CONSTANTINI; MOLLER, 2009), reduzindo assim tais efeitos maléficis para a reprodução das aves (SURAI, 2006).

Os antioxidantes são moléculas orgânicas de origem natural ou sintética, responsáveis por evitar a oxidação de compostos que possuem instauração na sua cadeia carbônica como ácidos graxos insaturados e algumas vitaminas lipossolúveis. Os antioxidantes naturais podem surgir de um ou mais compostos do próprio alimento (via endógena), de substâncias formadas de reações durante o processo ou como aditivos isolados de fontes naturais (CONGEGLIAN *et al.*, 2011). Os principais antioxidantes naturais fornecidos através da alimentação das aves são os tocoferóis (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C). A vitamina E é considerada um antioxidante e atua na etapa de propagação e terminação da oxidação lipídica, reagindo com os radicais livres e/ou sequestrando a molécula de oxigênio. O organismo das aves sintetiza vários antioxidantes sem a necessidade de os fornecer na alimentação, porém esses antioxidantes produzidos naturalmente no organismo animal precisam de percussores minerais como cobre, selênio, zinco, manganês para que assim ocorra a síntese de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (SURAI, 2006).

Os antioxidantes sintéticos são estruturas que possuem grupo fenólico e são derivados do ácido gálico sendo os principais antioxidantes utilizados: butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxiquirona terciário (BHQT) e o 6 etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetil quinona (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; BERTEQUINI, 2012). A utilização de antioxidantes sintéticos está relacionada a efeitos colaterais que os animais vêm apresentando com a alimentação dos mesmos com esse tipo de antioxidante, por isso vem se utilizando antioxidantes naturais para evitar esses efeitos nas aves (CONEGLIAN *et al.*, 2011).

Os antioxidantes podem atuar de diversas formas no organismo. Podem agir no organismo reduzindo os radicais livres de forma direta (antioxidante primário) ou indireta (antioxidante secundário). Os antioxidantes primários, como os compostos fenólicos, são consumidos durante a fase de iniciação. Os antioxidantes secundários, como o ácido ascórbico e ácido cítrico, irão atuar por meio de vários mecanismos incluindo a ligação com íons metálicos, a redução de oxigênio, a conversão de hidroperóxidos a espécies não-radicaís, a absorção de radiação ultravioleta ou a desativação do oxigênio singlete (AKOH; MIN, 2002; POKORNY *et al.*, 2001). O ácido ascórbico, assim como os ácidos cítrico e fítico, atuam na oxidação lipídica como agentes quelantes ou sequestrantes e são considerados antioxidantes secundários (CONEGLIAN *et al.*, 2011). Segundo Ramalho *et al.* (2006), o uso de agentes

sinérgicos, que possuem pouca ou nenhuma atividade antioxidante, podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usada em combinação adequada.

2.5 Uso de antioxidantes na alimentação de aves

O uso de antioxidante na alimentação animal é de suma importância, pois os mesmos agem como inibidores de radicais livres, interferindo no mecanismo de autocitação de lipídios (DECKER; XU, 1998). O fornecimento de antioxidantes na alimentação dos animais pode favorecer o produto produzido a partir desses animais, por exemplo, a carne e seus derivados, protegendo contra a deterioração causada pela oxidação de moléculas, facilmente oxidáveis como lipídios e proteínas, melhorando assim a vida útil desses produtos (BERTECHINI, 2012.; KARRE *et al.*, 2013). Diante dessa afirmação, Freitas *et al.* (2012), utilizando o extrato etanólico do caroço de manga na dosagem de 200 a 400 ppm, notaram que esse extrato foi responsável por retardar a oxidação lipídica da carne de frango.

Para a sua utilização na alimentação animal é necessário seguir alguns critérios para a seleção de um antioxidante de qualidade como: o antioxidante deve ser eficaz em baixas concentrações (0,001 a 0,01); deve ser economicamente viável; ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; não deve ser tóxico ao homem e aos animais domésticos e deve ser eficaz na concentração de gordura de origem vegetal e animal, vitaminas e outros alimentos que estão sujeitos à destruição oxidativa (CONEGLIAN *et al.*, 2011; BAILEY *et al.*, 1996).

Além disso, na escolha de um antioxidante deve-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (REFECAS *et al.*, 1998). De acordo com Rutz (1994) os antioxidantes são usados, de modo geral, em uma dosagem que varia de 50 a 500 ppm de alimento. Eles devem ser colocados na ração ou no alimento no momento em que obtido, para que dessa forma apresente resultados mais efetivos.

Goñi *et al.* (2007) relataram que ao fornecer bagaço de uva na alimentação de frangos de corte observou-se uma redução na oxidação lipídica da carne do peito e da coxa, estocados sob refrigeração por 7 dias. Com o objetivo de observar a estabilidade oxidativa dos ovos com o uso de antioxidante Botsoglou *et al.* (1997) forneceu uma ração contendo extrato de tomilho e verificou que esse antioxidante foi eficaz na estabilidade lipídica dos ovos.

O selênio é um mineral considerado um nutriente importante na dieta de aves estando relacionado ao sistema antioxidante do organismo, por fazer parte da enzima glutathiona

peroxidase (GIERUS, 2007). Ebeid (2009) estudando a suplementação de selênio na dieta de aves, comprovou que o selênio orgânico melhorou a qualidade do sêmen, bem como na concentração e mobilidade dos espermatozoides, diminuindo a porcentagem de espermatozoides mortos.

2.6 Ácido anacárdico

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta nativa brasileira e tem como fruto a castanha e como pseudofruto o caju. No Brasil, o caju é utilizado para o preparo de doces, sucos, geleias, xarope e bebidas (KUBO *et al.*, 2006). Além disso, as plantas da família Anacardiaceae vêm sendo estudadas para a obtenção de substâncias bioativas e uma dessas substâncias extraídas, é conhecida como ácido anacárdico (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006; KOZUBEK; TYMAN, 1999). O ácido anacárdico é um composto fenólico derivado do ácido salicílico, contendo uma cadeia lateral de 15 carbonos, que pode conter, duas ou três ligações insaturadas e é extraído a partir de diferentes partes do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) e podendo também ser encontrado em outras plantas como o Ginkgo biloba (WANG *et al.*, 1998) e espécies do gênero *Knema* (GONZALES *et al.*, 1996).

O ácido anacárdico é encontrado em maior proporção na castanha de caju de modo que é extraído o líquido da casca da castanha de caju (LCC) (CORREIA; DAVID, 2006; KOZUBEK; TYMAN, 1999). O LCC é um líquido viscoso escuro e oleoso e corresponde a 25% do peso da castanha sendo classificado como uma das fontes mais ricas em lipídios fenólicos iso-propenóides (CORREIA; DAVID, 2006; KOZUBEK; TYMAN, 1999). Existem dois métodos de extração do LCC. Esses métodos conhecidos como quente e frio e o modo como o LCC foi extraído produzirá um LCC diferente. Na extração a quente o ácido anacárdico sofre descarboxilação e é convertido em cardanol e essa extração é chamada de “LCC técnico”. É utilizado o termo “LCC natural quando o líquido é obtido a partir da extração com solventes (MATOS *et al.*, 1998).

Segundo alguns autores, o modo de extração pode interferir na composição do LCC. O LCC natural contém aproximadamente 65-70% de ácido anacárdico, 11-20% de cardol, 2-3% de metil-cardol e traços de cardanol. Para o LCC técnico, a composição do LCC relatada pelo os autores é de: 63-64% de cardanol, 11-20% de cardol e 24% de material polimérico (LUBIC; THACIL, 2003; VIEIRA, 2007).

Com o estudo do ácido anacárdico, foi se descobrindo as atividades biológicas que o mesmo apresenta benefícios a saúde animal e humana. Entre elas estão: atividade antitumoral;

antiacne; antibacteriana; moluscocida; antifúngica e antioxidante (TOYOMIZU *et al.*, 2003).

Kubo *et al.* (1993) sugeriram que o consumo contínuo do pedúnculo e de seus subprodutos pode favorecer o controle de tumores, apresentando assim uma atividade antitumoral. Wang *et al.* (1998) verificaram que o ácido anacárdico encontrado em *Ginkgo biloba* está associado ao tratamento e a prevenção de doenças cérebro-vasculares, cardiovasculares e tumoregênicas.

Existem vários estudos que comprovam a atividade antibacteriana que o ácido anacárdico apresenta. Narasimhan *et al.* (2008) estudando o efeito antibacteriano do ácido anacárdico descobriram que este ácido pode auxiliar a conservação de produtos de tomates, pois os autores inocularam *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ou *Escherichia coli* nos tomates e observaram que o ácido anacárdico foi ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Lima *et al.* (2000) utilizaram o ácido anacárdico com o intuito de verificar a atividade do mesmo sobre a cavidade bucal (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida utilis*) e observaram atividade antibacteriana contra os microrganismos citados, entretanto ocorreu uma maior atividade inibidora sobre as bactérias gram-positivas *Streptococcus mutans*, sendo esse microrganismo predominante na cavidade bucal.

Toyomizu *et al.* (2003) utilizaram frangos de corte submetidos a uma infecção experimental com oocistos de *Eimeria tenella* juntamente com o fornecimento de uma suplementação com ácido anacárdico e observaram que a adição de 0,8% de ácido anacárdico reduziu as lesões nos cecos promovidas pela coccidiose.

Alguns autores já verificaram a eficiência do ácido anacárdico como um agente antioxidante. Segundo Kubo *et al.* 2006, o ácido pode evitar com que íons metálicos de transição comecem o processo de oxidação, além de atuar na inativação nos intermediários desse processo e ainda podem inibir muitas enzimas que auxiliam no processo oxidativo. Apesar de alguns autores já terem comprovado a eficiência do ácido anacárdico como um agente antioxidante se faz necessária a ação desse ácido sobre a reprodução das aves e se esse ácido possui a capacidade de bloquear agente causadores da peroxidação lipídica.

3 INTRODUÇÃO

A coturnicultura vem se tornando uma atividade consolidada em território brasileiro. Tal consolidação se dá a diversos fatores tais com: sua produção de carnes e ovos (BATISTA, 2013), o excelente sabor da carne, o baixo custo de implantação, além de fornecer um retorno rápido do investimento por ser uma cultura de rápido crescimento e desenvolvimento (SILVA *et al.*, 2009). Contudo, os índices de produtividade das aves diminuem devido a problemas reprodutivos relacionados a fertilidade do macho que sofre danos a partir de um processo conhecido como peroxidação lipídica (SINHA; GUAPA., 2018).

A peroxidação lipídica é um processo consequente do estresse oxidativo que se dá através de uma série de eventos bioquímicos decorrentes das ações de radicais livres sobre os lipídios insaturados de membrana celular, que culmina na morte celular (BENZIE, 1996). No momento em que a membrana celular sofre o processo de peroxidação lipídica, há uma sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (ERO) no organismo. As EROs ou radicais livres são moléculas oxidantes geradas a partir do metabolismo aeróbico das células (AGARWAL *et al.*, 2006; SAALU, 2010) que, em concentração fisiológica, participam de vários processos vitais para os espermatozoides como maturação e capacitação (SAALU, 2010). Porém, quando em altas concentrações, as EROs causam danos a célula espermática, induzindo o processo de peroxidação lipídica, causando danos ao DNA e apoptose (KOTHARI *et al.*, 2010).

Uma forma de diminuir os efeitos prejudiciais dos radicais livres e consequentemente a peroxidação lipídica é através do uso de antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias capazes de interromper a ação oxidante dos radicais livres, diminuindo os efeitos negativos que podem afetar a reprodução e o sistema imunológico (BARREIROS *et al.*, 2006). Dentre os antioxidantes, temos o ácido anacárdico, que é um composto fenólico presente em diferentes partes do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (WANG *et al.*, 1998) que apresenta diversas atividades biológicas como atividade inibidora seletiva de bactérias gram-positivas (KUBO *et al.*, 1993a) e atividade antitumoral (KUBO *et al.*, 1993b) e, dentre elas, a atividade antioxidante (TOYOMIZU *et al.*, 2000). Como antioxidante, esse ácido age evitando que íons metálicos de transição comecem o processo de oxidação enzimática, inativando os intermediários da oxidação, e inibindo várias enzimas pró-oxidantes. Devido a essa característica, o ácido anacárdico vem ganhando destaque na produção avícola (KUBO *et al.*, 2006; KUBO *et al.*, 2006; TREVISAN *et al.*, 2006).

Alguns fatores como alta umidade relativa do ar, doenças, vacinações, flutuações de temperatura, metais pesados, baixa qualidade da ração e micotoxinas causam um aumento

da demanda de agentes antioxidantes que, na sua insuficiência, ocorre a formação e acúmulo de ERO (SURAI, 2006; WANG, *et al.*, 2009). Desse modo, a oferta de compostos antioxidantes através da alimentação, tornou-se uma forma viável para diminuir os efeitos negativos que o estresse oxidativo causa na produção e reprodução dos animais. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a ação do anacardato de cálcio sobre as características morfológicas, histológicas e proteômica do testículo e epidídimo de machos reprodutores de codornas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Químicos

Acrilamida, bis-acrilamida, ditiotreitól, ureia, tioureia, 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamonio] -1-propanossulfonatom, proteínas marcadoras de peso molecular e Coomassie Brilliant Blue G-250 foram adquiridos à GE Healthcare (Uppsala, Suécia). Todos os outros produtos químicos foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

4.2 Modelo experimental

O experimento foi realizado no setor de avicultura no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará – UFC, localizada na cidade de Fortaleza (3°43'6" S, 38°32'36" O), com tipo climático classificado como AW, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger (KÖPPEN-GEIGER, 1928).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos. Foram utilizados 22 machos com 140 dias de vida. Os animais foram distribuídos em quatro tratamentos (TABELA 1) sendo T1 (6 animais), T2 (6 animais), T3 (5 animais) e T4 (5 animais) de modo que, com exceção do tratamento 1 (controle), em cada tratamento havia a adição de 0,25%; 0,50%; 0,75% de anacardato de cálcio respectivamente durante um período experimental de 210 dias.

Os animais foram abatidos de acordo com o estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2015). A coleta das amostras e abate foi realizada no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram abatidos e logo em seguida pesados. Após pesagem, as aves foram colocadas em decúbito dorsal, para posterior incisões na região ventral, precedendo, posteriormente, a retirada das vísceras da cavidade corporal, com a finalidade de expor e permitir melhor visualização dos

órgãos do aparelho reprodutor do macho.

Tabela 1 - Composição percentual e nutricional calculada das rações experimentais utilizadas para codornas.

Ingrediente (%)	Níveis de Anacardato de Cálcio (%)			
	Controle	0,25	0,50	0,75
Milho	41,050	41,050	41,050	41,050
Farinha de soja	40,790	40,790	40,790	40,790
Calcário calcítico	7,550	7,550	7,550	7,550
Óleo de soja	6,600	6,600	6,600	6,600
Fosf. bicalcico	1,670	1,670	1,670	1,670
L - treonina	0,07	0,07	0,07	0,07
L - lisina	0,05	0,05	0,05	0,05
DL - metionina	0,270	0,270	0,270	0,270
Inerte	1,250	1,000	0,750	0,500
Sal	0,550	0,550	0,550	0,550
Premix vitamínico ¹	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix mineral ²	0,050	0,050	0,050	0,050
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição nutricional calculada				
Energia metabolizável (kcal/kg)	2800	2800	2800	2800
Proteína bruta (%)	21,00	21,00	21,00	21,00
Cálcio	3,00	3,00	3,00	3,00
Fósforo disponível (%)	0,300	0,300	0,300	0,300
Lisina digestível (%)	1,100	1,100	1,100	1,100
Met+cist digestível (%)	0,700	0,700	0,700	0,700
Metionina digestível (%)	0,419	0,419	0,419	0,419
Treonina digestível (%)	0,870	0,870	0,870	0,870

¹Composição por kg do produto: Vit. A – 9.000.000,00 UI; Vit. D3 -2.500.000,00 UI; Vit. E – 20.000,00 Mg; Vit. K3 – 2.500,00 mg; Vit. B1 – 2.000,00 mg; Vit. B2 – 6.000,00 mg; Vit. B12 – 15,00 mg; Niacina – 35.000,00 mg; Ácido pantotênico – 12.000,00 mg; Vit B6 – 8.000,00 mg; Ácido fólico – 1.500,00 mg; Selênio – 250,00 mg; Biotina – 100,00 mg; ²Composição por kg do produto: Ferro – 100.000,00 mg; Cobre – 20,00 g; Manganês – 130.000,00 mg; Zinco – 130.000,10 mg; Iodo – 2.000,00 mg.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi realizado então à dissecação e retirada dos testículos e epidídimos. Os testículos foram então pesados e medidos (comprimento, diâmetro e volume), e com o peso da ave e o peso testicular foi colhido o índice gonadossomático testicular a partir da equação (peso da

ave/peso do testículo * 100%). Após a aquisição dos dados morfométricos, os testículos foram separados sendo um para a proteômica e o outro para a histologia e os epidídimos reservados para a histologia. Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal – UFC (CEUA/UFC/2552250718/2018).

4.3 Histologia

Para a histologia os testículos e epidídimos foram colocados em tubos de 50 ml e fixados em solução de formaldeído a 10% durante 24 horas. Após o período de fixação, somente os testículos, por serem maiores, foram clivados para a obtenção de tamanhos próximos a 5 mm (CAPUTO *et al.*, 2010). As amostras clivadas e os epidídimos foram colocados em microtubos com a solução de fixação e levadas a Central Analítica da Universidade Federal do Ceará – UFC, para o processamento, corte e captura das imagens.

4.3.1 Microscopia óptica

Na central analítica, as amostras passaram pelo processamento técnico. Esse processamento tem como objetivo preparar as peças para que, posteriormente, possam ser emblocadas e cortadas (NUNES; CINSA, 2016). O processamento foi realizado seguido as seguintes etapas: lavagem, desidratação, infiltração e emblocamento. Para a realização da lavagem das amostras foi utilizado álcool etílico 50%, por três vezes, com intervalo de 40 minutos. Após a lavagem, as amostras sofreram o processo de desidratação com álcool etílico em série decrescente de 50%, 70%, 90% e 100% com 45 minutos de intervalo. Em seguida as amostras foram infiltradas com historresina 1:1 álcool etílico por 48 horas e outra infiltração com historresina por 24 horas (NUNES; CINSA, 2016; PINHEIRO, 2017). Para o emblocamento, as amostras foram colocadas em cápsulas de gelatina e adicionado historresina e Hardener e em seguida expostas a luz por 24 horas. Após a polimerização da historresina, os blocos foram colocados em pedaços de madeira e cortados a 0,6 µm realizado no micrótomo (LEICA) e os cortes foram colocados em lâminas para microscopia. A coloração foi realizada com solução azul de toluidina 1% (O'Brien *et al.* 1964) e sobre os cortes foi colocado lamínulas com o auxílio do VERNIZ®. As capturas das imagens foram realizadas por microscópio Zeiss Primo Star com câmera de captura AxioCam 150 color. Foi utilizado o *software* ZEN lite 2.1 para análise das imagens. Para a coleta de mensurações das imagens foi utilizado o *software* ImageJ 1.8.0.

4.4. Proteômica

Os testículos utilizados para a proteômica foram congelados em nitrogênio (N₂) e liofilizados até que estivessem totalmente secas utilizando-se um liofilizador (Labconco, MO, USA) a – 55°C e uma pressão atmosférica de 0,035 mBar, por um período de aproximadamente 24 horas. Após liofilização, as amostras foram maceradas para posterior extração das proteínas. Para a extração das proteínas foi utilizado 500 µl da solução de lise (Triton X-100 0,1%), em microtubos contendo 10 mg de amostra liofilizada. Em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por 1 minuto e armazenadas na geladeira por uma hora a 4°C, sob leve agitação. Após esse período, foi adicionado 400 µL de tampão de amostra (7 M ureia, 2 M tiourea, 40 mM ditiotreitol, 4% 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanossulfonato). As amostras foram sonicadas em água utilizando um banho ultra-sônico (Fisher Scientific™ CPXH5 Series Ultrasonic Baths; Pittsburgh, PA, USA) operado a 120W, frequência de 40 kHz a 25°C durante 1 minuto e em seguida centrifugadas a 12000 x g por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi reservado e a quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.4.1 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

As proteínas foram separadas utilizando o método 1D SDS-PAGE. Para isso 40 µg de proteína de cada amostra foram adicionadas ao tampão de amostra (0,125 M Tris-HCl, 20% (v/v) glicerol, 4% (p/v) SDS, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8), aquecidas por 90 segundos e adicionadas em gel de poliacrilamida a 12,5%, utilizando o sistema SE 600 Ruby TM (GE Life Sciences, EUA) a 500 V, 90 W, 25 mA/gel. Após a corrida, os géis foram corados utilizando a solução Azul Brilhante de Coomassie (CBB – R250) por 12 horas, seguindo por descoloração com solução de metanol e ácido acético (40%:10%). Após descoloração, os géis foram digitalizados com o auxílio do ImageScanner III (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), e salvo como formato de arquivo .tiff, sendo então analisado com o auxílio do software Quantity One® v.4.6.3 (Bio-Rad, Rockville, MD, EUA).

4.4.2 Identificação das proteínas e pesquisa de dados

Após a identificação das bandas pelo software Quantity One® (BioRad, EUA), foi realizado o corte das bandas em pedaços de aproximadamente 1mm³ e realizado a digestão

trípica, de acordo com Shevchenko *et al.* (1996) e adaptado por Fernandes *et al.* (2018). Os peptídeos trípticos foram separados em coluna BEH300 C18 (100 μm \times 100 mm) utilizando o sistema nanoAcquity™ (Waters Corp., EUA) e eluídos a 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ com um gradiente de acetonitrila (5–85%) contendo 0,1% de ácido fórmico. O sistema de cromatografia líquida foi ligado a uma fonte de espectrometria de massa de nanoelectrospray (sistema SYNAPT HDMS, Waters Corp., EUA). O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo usando uma temperatura de fonte de 90°C e uma voltagem capilar de 3,5 kV. O instrumento foi calibrado com fragmentos do duplo íon protonado (phosphoric acid, m/z 686.8461), e a massa de bloqueio utilizada durante a aquisição foi o íon intacto. O procedimento LC-MS/MS foi realizado de acordo com o método de aquisição dependente de dados (DDA), selecionando os íons precursores MS/MS duplamente ou triplamente carregados. Íons foram fragmentados por dissociação induzida por colisão, usando argônio como energia de colisão de gás de colisão e rampa que variou de acordo com o estado de carga do íon precursor selecionado. A aquisição de dados foi realizada em um intervalo m/z de 300 a 2100 para a pesquisa MS (1 varredura/s), em um intervalo de m/z de 50 a 2500 para MS/MS. Os dados foram coletados com o software MassLynx 4.1, processados usando o Protein Lynx Global Server 2.4 (Waters Corp.) e foram convertidos em arquivos de texto de lista de pico para pesquisa de banco de dados (.pkl). Os dados foram enviados para um servidor da Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido, v.2.6) para fazer buscas no banco de dados NCBIprot e SwissProt. As pesquisas foram feitas de acordo com os seguintes critérios: máximo de uma perda de clivagem de tripsina, peptídeos monoisotópicos com carga +1, +2 e +3, com modificação variável de resíduos de metionina oxidada e variação fixa de resíduos de cisteína carbamidometilados usando o modo de busca de íons MS/MS.

4.4.3 Ontologia gênica e interações proteicas

Logo após a identificação das proteínas do testículo pelo Mascot, foi realizado a ontologia genica, utilizando o software para pesquisa de anotações de proteínas (STRAP v 1.5.0.0). Os termos da ontologia genética para o processo biológico, função molecular e componente celular foram obtidos de bancos de dados UniProtKB (BHATIA *et al.*, 2009).

As redes proteína-proteína foram recuperadas da base de dados STRING (<http://string-db.org>) versão 10.0 (Snel *et al.*, 2000). Este banco de dados consiste em mostrar as interações de proteínas conhecidas e previstas coletadas de associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). A análise de rede foi avaliada apenas com as proteínas diferencialmente

expressas nas bandas encontradas, as quais possuem função antioxidante e que apresentassem interações com significância estatística (PPI enrichment p-value ≤ 0.05). Quando não havia relatos descritos com a codorna europeia ou registros para o gênero *Cortunix*, foram utilizadas descrições com o galo doméstico (*Gallus gallus*).

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi conduzida considerando o delineamento inteiramente casualizado, com 4 dietas e 6 repetições. Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para confirmar a distribuição normal. Quando os dados não tiveram distribuição normal, foram transformados em Log10. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A comparação das médias, entre os grupos de tratamentos, foi estimada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R (versão 3.4.4).

5 RESULTADOS

5.1 Dados morfométricos dos testículos

Os animais que, em sua dieta, não houve a adição de anacardato de cálcio apresentaram valor médio do peso testicular de 3,83 g com desvio padrão de 1,24 (TABELA 2). Ao observamos o peso testicular dos animais que, em sua dieta, havia à adição de 0,75%, o valor médio do peso testicular foi de 3,94 g e desvio padrão de 1,22, valores esses próximos ao relatados no tratamento controle. Ao analisar os valores médios do peso testicular observou-se que não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos utilizados. Com relação aos valores médios obtidos sobre o comprimento, diâmetro e volume testicular (TABELA 2) também não se observou significância nos resultados obtidos. O valor médio do índice gonadossomático obtido no tratamento controle foi de 2,79% e desvio padrão de 0,94. Esse resultado foi maior que o obtido no tratamento com adição de 0,75% de anacardato de cálcio ($2,41\% \pm 0,81$), porém, também não se observou diferença significativa entre os tratamentos com relação ao índice gonadossomático do testículo de codornas europeias. O peso da ave foi outro valor obtido nesse experimento e que, após análise dos dados, observou-se diferença não significativa entre os tratamentos (TABELA 2).

Tabela 2 - Dados morfométricos do testículo e peso da ave de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) alimentadas com diferentes níveis de ácido anacárdico (média±desvio-padrão).

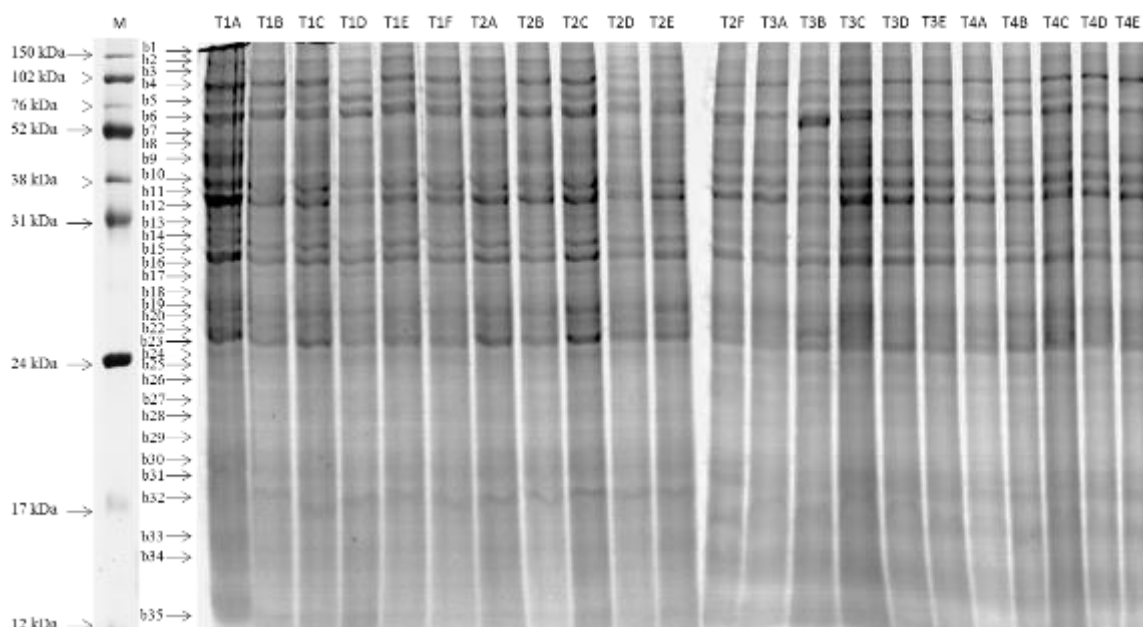
	Níveis de anacardato de cálcio (%)			
	Controle	0,25	0,50	0,75
Testículo				
Peso (g)	3,83±1,24	3,91±0,29	4,91±0,77	3,94±1,22
Comprimento (mm)	23,88±3,72	25,24±2,71	28,5±2,91	25,68±3,96
Diâmetro (mm)	16,86±1,97	17,66±0,90	19,6±1,56	17,46±1,97
Volume (cm ³)	3,68±1,39	4,12±0,50	5,82±1,34	4,22±1,65
IGS (%)	2,79±0,94	2,31±0,25	3,19±0,61	2,41±0,81
Peso da ave				
Peso(g)	295,9±8,4	327,25±17,2	309,49±16,1	328,24±17,1

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2 Análise proteômica

Utilizando a técnica de eletroforese SDS-PAGE 1D um total de 35 bandas foram observadas nos géis do tecido testicular de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) com peso molecular entre 150 a 12 kDa, como ilustra a figura 1.

Figura 1 - Gel de poliacrilamida de proteínas do testículo de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) da linhagem europeia, com SDS-PAGE de 12,5% corado com azul de Coomassie.



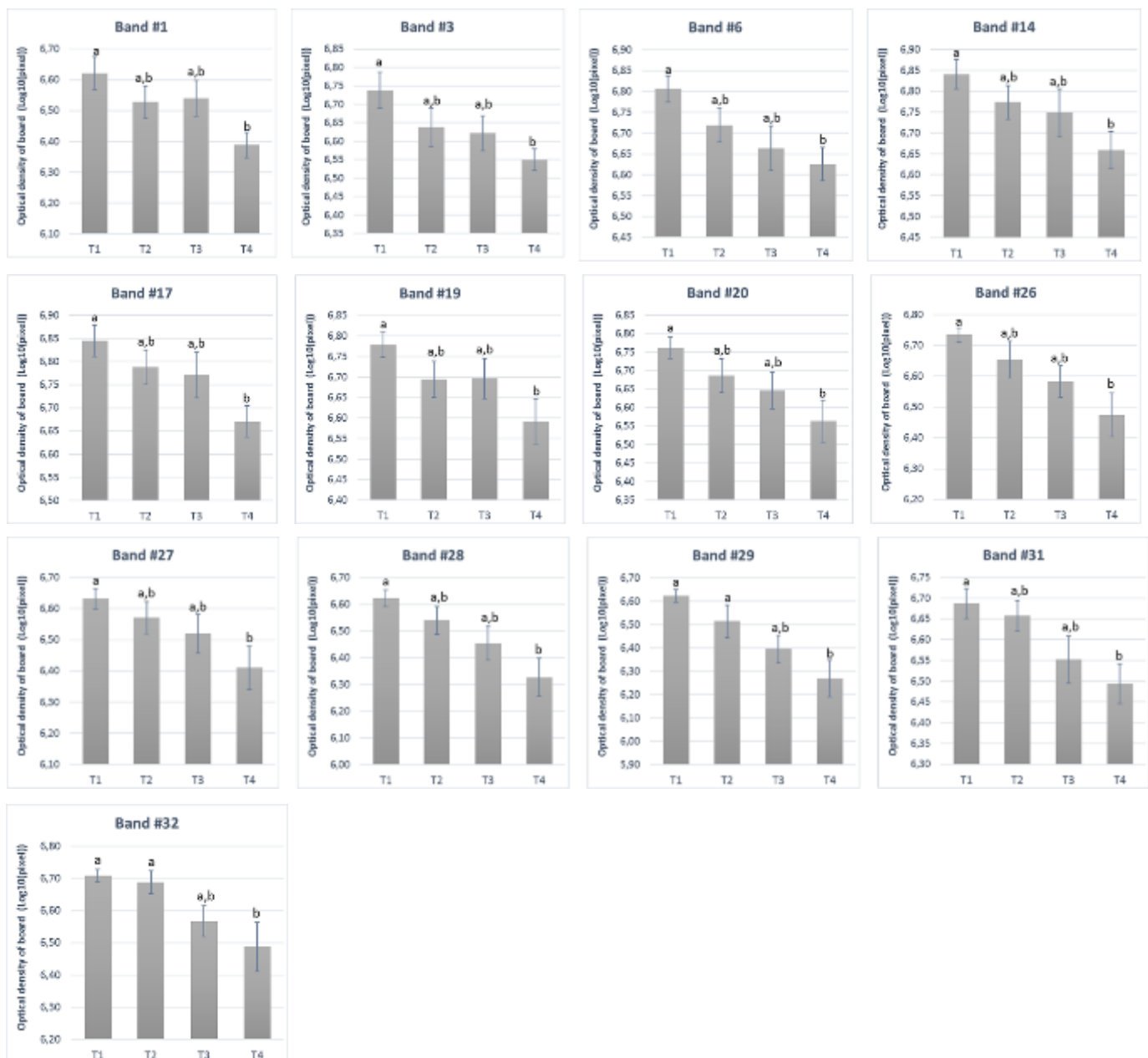
O experimento foi dividido em quatro tratamentos (1,2,3,4), com as repetições representadas pelas letras (A, B, C, D e E). T1: Controle; T2: 0,25%; T3: 0,50%; T4: 0,75%.

Fonte: O autor

Deste total de bandas, apenas 13 mostraram-se diferentes entre os tratamentos (FIGURA 2). Das 13 bandas que se destacaram nesse estudo, o tratamento com 0,75% de ácido

anacárdico se mostrou diferente do tratamento controle em todas as bandas. Em duas bandas (29 e 32) o tratamento com 0,75% apresentou diferença também com o tratamento com 0,25% de anacardato de cálcio (T2). Nessas bandas, foram encontradas importantes proteínas ligadas a reprodução, como a *piwi-like protein 1* (PIWL1) e *heat shock protein HSP 90-alpha* (HS90AA1).

Figura 2 - Perfil de intensidade das bandas de testículo de codornas alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio.



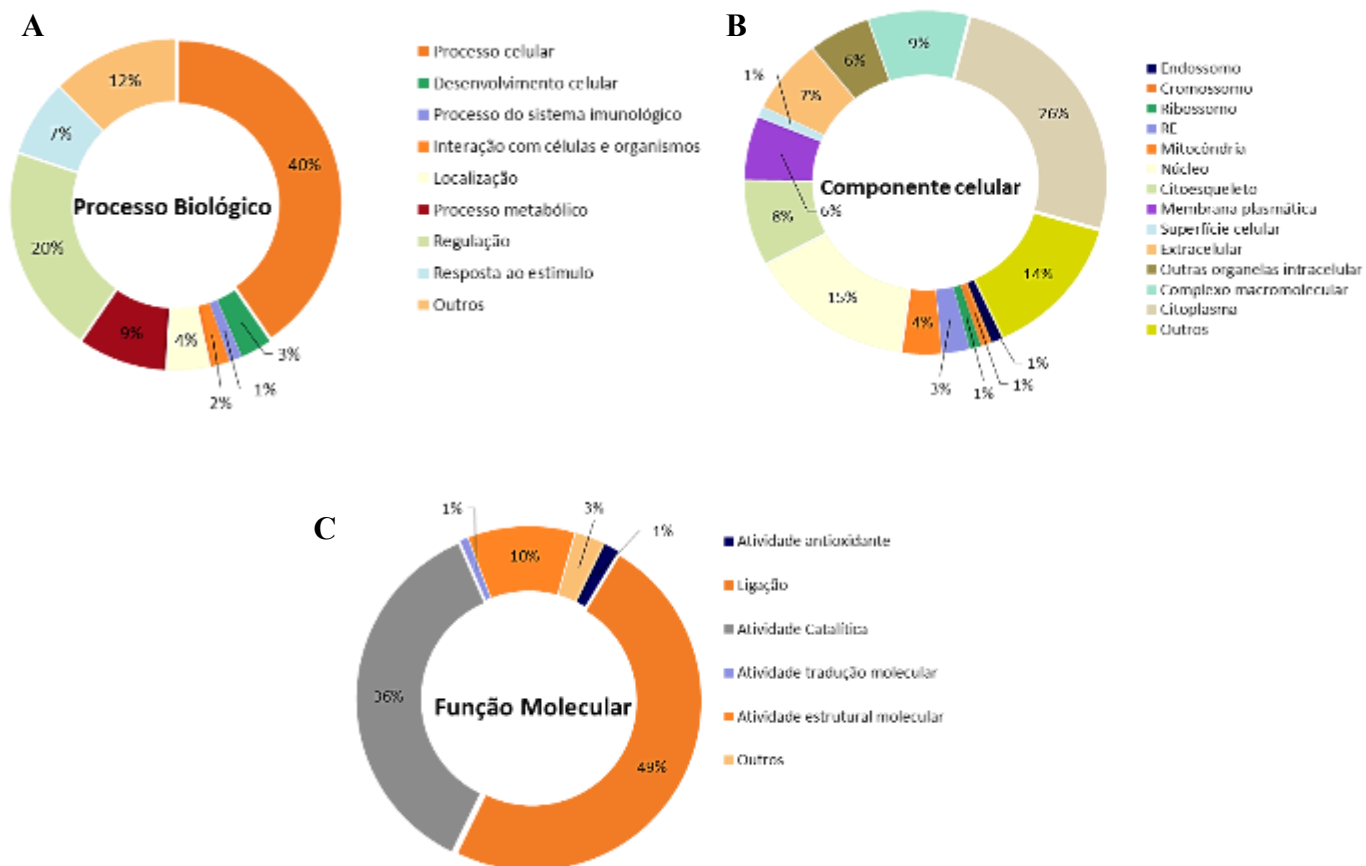
T1: Controle; T2: 0,25% Anacardato de cálcio; T3: 0,50% Anacardato de Cálcio; T4: 0,75% Anacardato de cálcio.
Fonte: O autor

Por meio da espectrometria de massa foram identificadas um total de 152 proteínas no testículo de codornas europeias (TABELA 3). Desse total, foi identificado algumas proteínas

que auxiliam na proteção do organismo contra os efeitos negativos do estresse oxidativo como a: *heat shock cognate 71 kDa protein* (HSPA8), *stress-70 protein, mitochondrial* (HSPA9), *superoxide dismutase [Cu-Zn]* (SOD1) e *peroxiredoxin-6* (PRDX6).

As porcentagens atribuídas para processo biológico, componente celular e função molecular a partir da ontologia gênica do tecido testicular de codorna, estão mostradas na figura 3. Os dois principais processos biológicos das proteínas identificadas no tecido testicular de codornas são o processo celular (40%) e regulação (20%). Como componente celular, observou-se que a maioria das células estão no citoplasma (26%) e 15% no núcleo. As funções mais importantes atribuídas as proteínas identificadas são de ligação (49%) e atividade catalítica (36%), sendo atribuída 1% para atividade antioxidante.

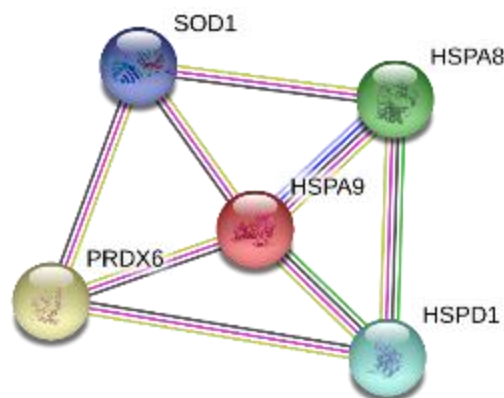
Figura 3 – Anotações da ontologia gênica do proteoma do testículo de codornas alimentadas com anacardato de cálcio em função do processo biológico (A), componente celular (B) e função molecular (C).



Fonte: STRAP

A análise de interação interproteica teve como base as proteínas envolvidas nos processos antioxidativos e que se diferenciaram significativamente ($p < 0,05\%$) sendo elas: *Superóxido dismutase [Cu – Zu]* (SOD1); *Peroxideroxin-6* (PRDX6); *Stress-70 protein* (HSPA9); *60 kDa heat shock protein* (HSPD1) e *Heat shock cognate 71 kDa protein* (HSPA8)) observando-se interação entre as cinco proteínas estudadas a partir dessa rede de interação (FIGURA 4).

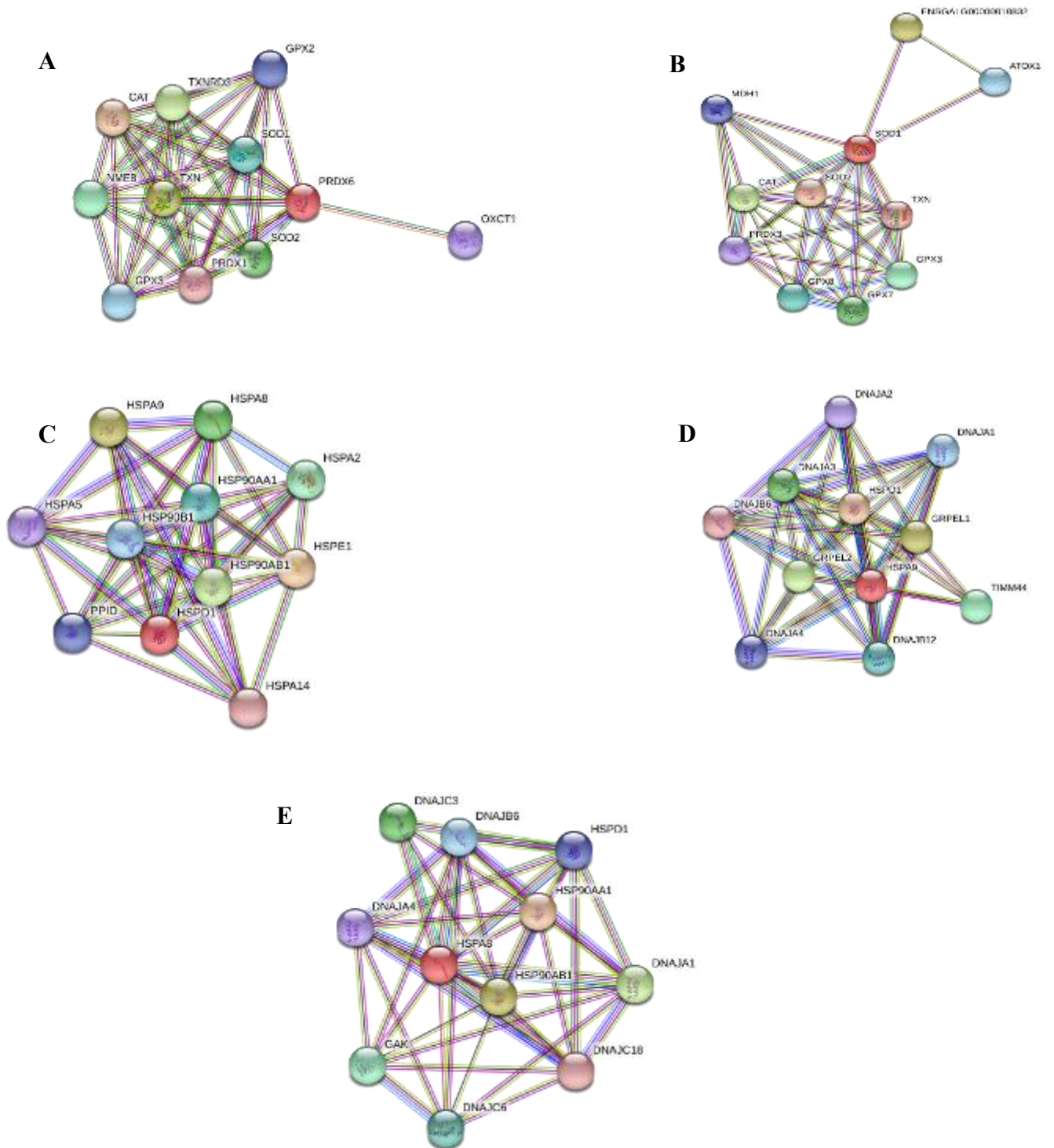
Figura 4 – Redes de interação interproteica de proteínas: *Superóxido dismutase [Cu – Zu]* (SOD1); *Peroxideroxin-6* (PRDX6); *Stress-70 protein* (HSPA9); *60 kDa heat shock protein* (HSPD1) e *Heat shock cognate 71 kDa protein* (HSPA8) obtidas através do aplicativo STRING, mostrando interações no modo evidência. Linhas de cores diferentes representa os tipos de evidência para a associação. (-) *Text-mining*; (-) Experimentos; (-) Co-expressão; (-) Co-ocorrência; (-) *gene neighborhood*; (-) homologia.



Fonte: STRING

A figura 5 mostra a rede de interação de cada proteína com função antioxidante observando interações com outras proteínas antioxidantes. Diante desses resultados, proteínas como a *Stress-70 protein* (HSPA9) mostraram interação com *DnaJ homolog subfamily B member 6* (DNAJB6) e a *60 kDa heat shock protein, mitochondria* (HSPD1).

Figura 5 – Análise *in silico* das redes de interação interproteica das proteínas que foram diferencialmente expressas no testículo de codornas europeia (*Coturnix coturnix coturnix*), obtidas com base no banco de dados STRING com o intuito de verificar interações com outras proteínas que possuem função antioxidante. (A) peroxiredoxin-6 (PRDX6), (B) superoxide dismutase [Cu-Zu] (SOD1), (C) Stress-70 protein, mitochondrial (HSPD1), (D) 60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPA9), (E) Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8). (-) *Text-mining*; (-) Experimentos; (-) Co-expressão; (-) Co-ocorrência; (-) *gene neighborhood*; (-) homologia.



Fonte: STRING

5.3 Histologia

Nesse estudo, a partir da histologia obteve-se valores do diâmetro do túbulo seminífero, altura do túbulo seminífero e diâmetro do ducto epididimário como ilustrado na tabela 4. Não se observou diferença significativa entre os tratamentos com relação ao diâmetro do túbulo seminífero. No tratamento controle, a média do diâmetro do túbulo seminífero foi de 183,5 μm com desvio padrão de 7,9. Esse valor foi inferior à média obtida no tratamento 4 (221,3 $\mu\text{m} \pm 38,3$), onde houve a adição de 0,75% de anacardato de cálcio, porém não se observou diferença entre os tratamentos.

Tabela 4 – Valores médios dos parâmetros morfológicos do testículo e epidídimo de codornas europeias alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio. (média \pm desvio-padrão)

Parâmetros	Níveis de anacardato de cálcio (%)			
	Controle	0,25	0,50	0,75
DTS (μ)	183,5 \pm 7,9	202,8 \pm 23,4	185,8 \pm 19,2	221,3 \pm 38,3
AES (μ)	71,2 \pm 17,5 ^a	70,1 \pm 19,8 ^a	41,2 \pm 11,3 ^b	45,6 \pm 14,8 ^b
DDE (μ)	29,9 \pm 13,4 ^b	50,1 \pm 29,5 ^b	46,2 \pm 20,2 ^b	101,5 \pm 65,8 ^a

DTS: Diâmetro do túbulo seminífero; DDE: Diâmetro do ducto epididimário; AES: Altura do epitélio seminífero. Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor.

A altura do epitélio seminífero foi influenciada pelo nível de anacardato de cálcio na dieta dos animais, de modo que houve diferença significativa entre os tratamentos (TABELA 4). Os animais que não foram alimentados com anacardato de cálcio (tratamento controle) apresentaram um valor médio de 71,2 μm valor esse próximo ao tratamento onde houve a alimentação dos animais com 0,25% que foi de 70,1 μm . Entre esses dois tratamentos não houve diferença. Porém, o tratamento 3 (0,50%) e 4 (0,75%) se diferenciaram do tratamento 1 (controle) e 2 (0,25%). Os tratamentos 3 e 4 obtiveram, respectivamente, valores médios de 41,2 μm e 45,6 μm .

Em relação ao diâmetro do ducto epididimário nota-se que o aumento de nível de anacardato de cálcio na dieta de codornas, também influenciou os valores obtidos para o diâmetro do ducto epididimário. O tratamento controle teve média de 29,9 μm , o tratamento 2 obteve valor de média igual a 50,1 μm e o tratamento 3 com média de 46,2 μm . Esses três tratamentos não se diferenciaram entre si. Entretanto, o tratamento com 0,75% de anacardato

de cálcio diferenciou-se dos demais, obtendo média de 101,5 μm valor esse superior aos relatados nos demais tratamentos (TABELA 4).

As quantidades de células do testículo de codorna estão ilustradas na tabela 5. Nota-se que a alimentação das codornas com anacardato de cálcio resultou em diferença não significativa entre os tratamentos. No tratamento controle foram observados valores médios de 38 espermatogônias, 104,5 espermatócitos e 228,5 espermatídes. No tratamento com 0,25% de anacardato de cálcio os valores obtidos foram de 58 espermatogônias, 86 espermatócitos e 309,5 espermatídes. Os valores de 71,5 espermatogônias, 146 espermatócitos e 329 espermatídes foram atribuídos ao tratamento 3. Para o tratamento 4 foram observados os resultados de 73,5 espermatogônias, 120,5 espermatócitos e 287 espermatídes.

Tabela 5 - Quantidade de células presente no túbulo seminífero de testículos de codornas europeias alimentadas com diferentes níveis de anacardato de cálcio.

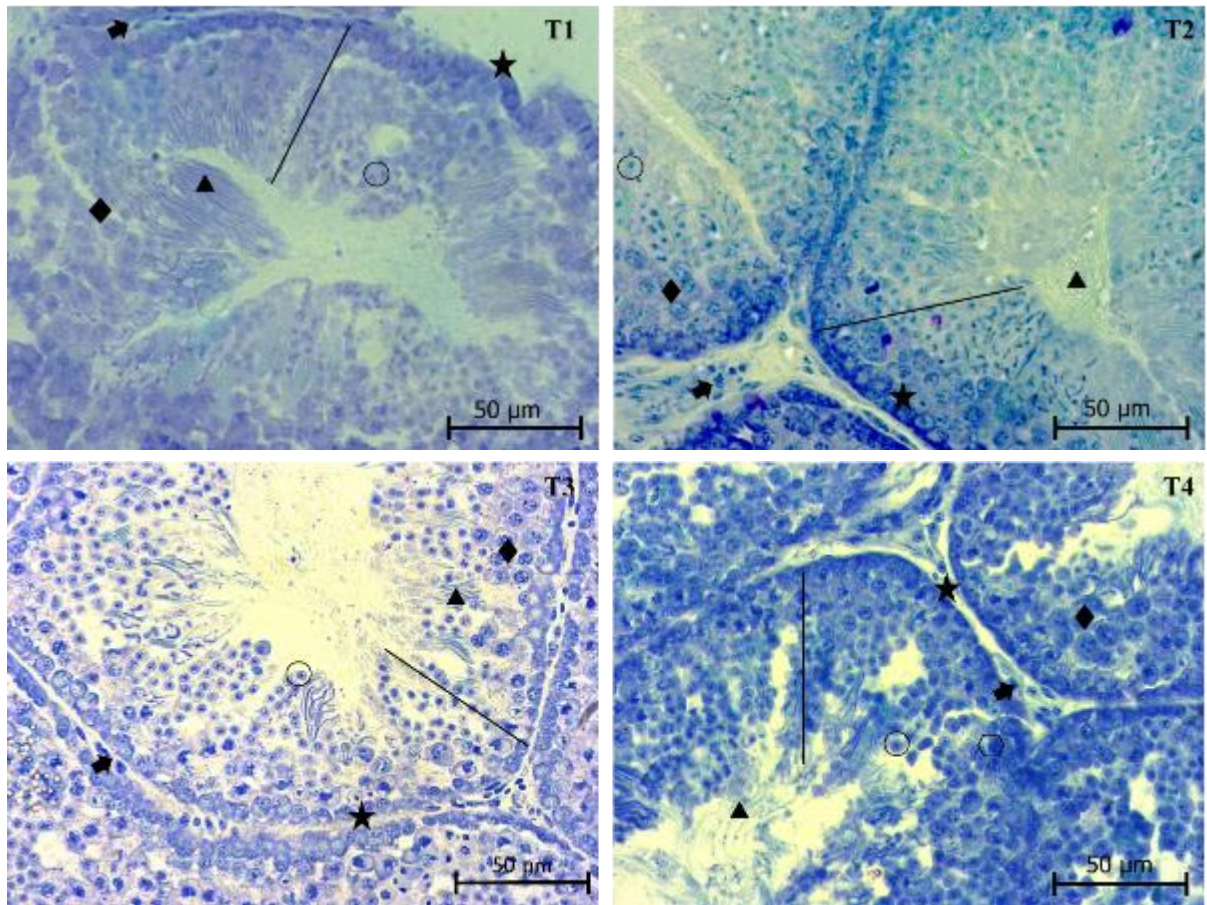
Células	Níveis de anacardato de cálcio (%)			
	Controle	0,25	0,50	0,75
ESPG	38 \pm 4,24	58 \pm 19,78	71,5 \pm 14,84	73,5 \pm 24,74
ESPT	104,5 \pm 20,5	86 \pm 12,7	146 \pm 19,7	120,5 \pm 9,19
ESPD	228,5 \pm 26,1	309,5 \pm 27,6	329 \pm 26,9	287 \pm 38,9

ESPG: Espermatogônia; ESPT: Espermatócitos; ESPD: Espermatídes.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Através da microscopia óptica foi possível capturar as imagens do túbulo seminífero (FIGURA 6) e do epidídimo (FIGURA 7) de codornas e assim observando nelas algumas diferenças em relação aos tratamentos. Observou-se a presença de células germinativas em diferentes fases da espermatogênese como espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, e espermatozoides, além de verificar a presença de células de Leydig e células de Sertoli (FIGURA 6). O epitélio germinativo do túbulo seminífero mostra-se maior e melhor organizado nos tratamentos 1 e 2 quando comparados ao tratamento 3 e 4, onde se observa uma desorganização no epitélio germinativo. Nas imagens obtidas do epidídimo de codornas, nota-se a presença de espermatozoides, além de células ciliadas e não ciliadas no ducto eferente. Observa-se também que no tratamento 2 há uma menor concentração de espermatozoides no ducto epididimário quando comparado ao tratamento 1.

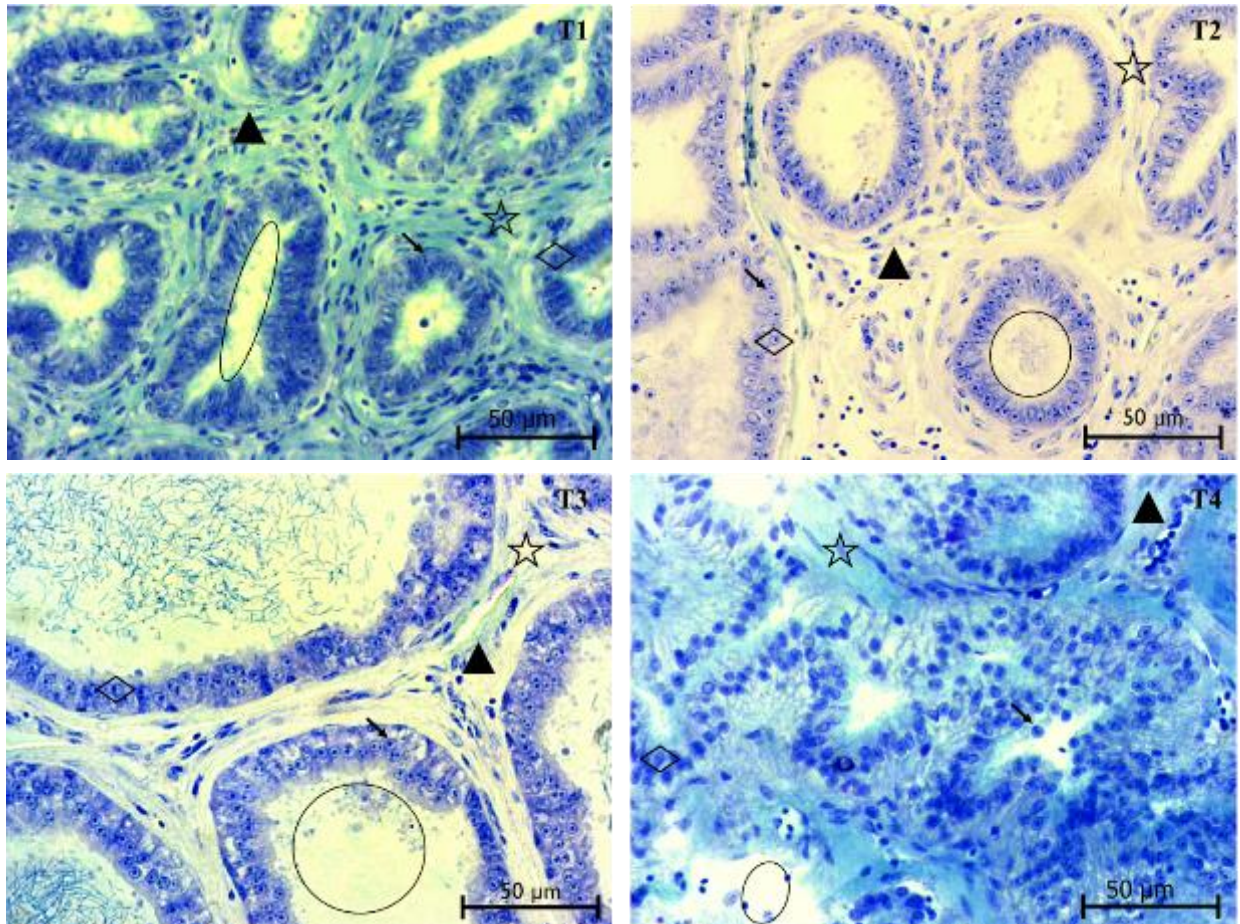
Figura 6 – Microscopia óptica do túbulo seminífero de codornas europeias alimentadas com anacardato de cálcio.



Espermatogônias (★); Espermatócitos (◆); Espermatídes (◯); Espermatozoides (▲); Célula de Leydig (▼); Célula de Sértoli (◯); Epitélio seminífero (—).

Fonte: ZEN Lite 2.1

Figura 7 – Microscopia óptica do epidídimo de codornas europeias alimentadas com anacardato de cálcio.



Ducto eferente (○); Ducto epididimário (▲); Espermatozoide (☆); Célula principal não ciliada (◊); Célula principal ciliada (→).

Fonte: ZEN lite 2.1

6 DISCURSSÃO

6.1 Dados morfométricos dos testículos

Nesse experimento observou-se que o anacardato de cálcio não apresentou efeito significativo sobre o peso testicular de codornas. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Biswas *et al.* (2007), ao utilizar diferentes concentrações de vitamina E (150-300 UI), considerado um importante antioxidante, na dieta de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) de modo que os autores observaram diferença não significativa sobre o peso testicular. De acordo com Santos *et al.* (2012), o peso testicular é estabilizado a partir dos 60

dias de idade. Os autores realizaram um experimento com codornas de corte e de postura dos 60 aos 360 dias de idade, observando que após os 60 dias o peso testicular era estabilizado resultando em valores médios de peso testicular de 3,59 g para codornas de corte e 2,49 g para codornas de postura. Santos *et al.* (2012) não utilizaram nenhum tipo de antioxidante na dieta dos animais, diferente desse experimento que utilizou o anacardato de cálcio e obteve maior valor médio de peso testicular do que o observado no estudo de Santos. Diante disso, a utilização de antioxidante, mesmo em animais abatidos com 350 dias, não surtiu efeito negativo sobre o peso testicular, podendo a alimentação dos animais ter contribuído para maiores valores de peso testiculares.

Com relação ao comprimento testicular, valores médios entre 23,88 a 28,5 mm foram obtidos nesse experimento de modo que não foi observado diferença significativa. Lanna (2012) observaram valor médio de 24,21 mm para comprimento testicular de codorna aos 60 dias de idade. Com a utilização de 0,50% de anacardato de cálcio, o valor médio obtido nesse experimento foi de 28,5 mm resultado esse superior ao encontrado por Lanna, que não utilizou nenhum antioxidante na dieta das aves. O anacardato de cálcio pode ter surtido efeito positivo sobre o comprimento testicular a partir da observação dos resultados obtidos por Lanna, que não utilizou antioxidante, quando comparados aos resultados obtidos nesse experimento. Os valores médios do diâmetro testicular em codornas alimentadas com antioxidantes foi de 16,88 a 19,6 mm (TABELA 2).

Autores como Lanna (2012) e Santos *et al.* (2012) também relataram o diâmetro testicular de codornas obtendo valor médio próximo a 14,5 mm. Isso mostra que com a utilização do anacardato de cálcio, houve um aumento do diâmetro testicular, sendo o maior valor entre os tratamentos de 19,6 mm onde houve o fornecimento de 0,50% de anacardato de cálcio, podendo então favorecer o diâmetro testicular na observação de maiores valores. Os dados morfométricos de peso, comprimento e diâmetro não foram significativamente diferentes entre os tratamentos, porém a utilização de anacardato de cálcio pode ter surtido efeito positivo sobre os dados morfométricos quando se observa valores já obtidos por outros autores que não utilizaram antioxidantes na dieta animal.

Com relação ao peso de carcaça, nota-se que com a adição de 0,75% na dieta de codornas há um maior peso corporal (328,24 g), porém não houve diferença significativa entre os tratamentos (TABELA 2). Santos *et al.* (2012) observaram estabilidade do peso corporal de codornas aos 60 dias de idade com um valor médio 240,86 g para codornas de corte. Esse valor obtido por Santos é próximo ao obtido nesse experimento quando não se utilizou anacardato de cálcio (295,9 g), porém quando houve a adição de anacardato de cálcio os valores foram

superiores a esse. Então, a partir desse dado supõe-se que o uso desse antioxidante, pode também ter favorecido um aumento do peso das aves.

A partir do peso corporal e do peso testicular obteve-se o índice gonadossomático. Esse índice é fundamental para avaliar o tamanho testicular, além de ter relação com a produção espermática (KENAGY; TROMBULAK, 1986). Nesse trabalho, a média do IGS em todos os tratamentos foi de 2,52%. Esse valor é próximo ao já relatado por Clulow e Jones (1982) e Orsi et al., (2005), que relataram IGS de 2,26% para a codorna japonesa e 2,6% para a codorna italiana, respectivamente. Contudo autores como Lanna *et al.*, (2013) e Santos *et al.*, (2012) encontraram valores próximos a 3,7% indicando assim uma maior capacidade de produção e armazenamento de espermatozoides, pois testículos leves e pequenos estão relacionados a uma menor capacidade reprodutiva da ave devido a uma baixa taxa de espermatogênese e produção de testosterona (SANTOS *et al.*, 2012; MOLLER, 1991).

6.2 Análise proteômica

É possível observar uma grande diferença do tratamento 4 (T4) quando comparado ao controle (T1), de maneira que a medida que os animais eram alimentados com uma maior percentagem de anacardato de cálcio, ocorriam, numericamente, diminuições nas expressões das proteínas. No organismo animal, existe um sistema natural de eliminação de radicais livres, conhecido como sistema enzimático de defesa que tem como finalidade produzir enzimas que protegem o organismo contra agentes oxidativos sem a necessidade de fornecê-las na alimentação (MACHLIN; BENDICH, 1987). São eles: Catalase, Glutaiona peroxidase, Superóxido dismutase e Metionina-dismutase os quais combatem os seguintes radicais livres: Peróxido de hidrogênio, superóxido, oxigênio single, íons hidroxila, óxido nitrito e óxido nitroso (MACHLIN; BENDICH, 1987). A partir dessa afirmação, acredita-se que a diminuição das expressões das proteínas decorrente do aumento gradativo do percentual de anacardato de cálcio na dieta das codornas, seja resultado da presença de antioxidantes oriundos da alimentação e com isso, o sistema enzimático de defesa não necessitou produzir tantas enzimas antioxidantes, pois já havia o fornecimento de tais enzimas na alimentação. É importante ainda enfatizar que este trabalho foi o primeiro a verificar o efeito da suplementação alimentar de ácido anacárdico na proteômica do tecido testicular de codornas europeias.

Entre as bandas que se mostraram diferentes nesse experimento, observou-se que algumas apresentavam proteínas importantes para a reprodução, assim como para a proteção do organismo contra os efeitos dos EROs. Na banda 6, por exemplo, observou-se a presença do

gene *piwi like protein 1* (PIWL1) e a heat shock protein 90 kDa alpha (HS90AA1). A presença da proteína PIWL1 no tecido testicular é muito importante, pois essa proteína está envolvida no processo de desenvolvimento do embrião e também está relacionada a espermatogênese de modo que sua ausência pode causar danos as células germinativas durante a meiose ou sofrer apoptose (CHEN *et al.*, 2013; ROOVERS *et al.*, 2015). Segundo Chang *et al.* (2015), há poucos relatos sobre os genes PIWI em aves, porém Chen *et al.* (2013) mostraram que os frangos apresentam uma maior expressão do gene PIWL1 nos testículos e essa expressão está diretamente relacionada com a idade dos animais. Já HS90AA1 está relacionada com o estresse ambiental ao qual o animal é submetido e é produzida com o intuito de proteger o testículo contra a oxidação lipídica, evitando assim danos a espermatogênese. Nos testículos de mamíferos, essa HSP é essencial para a espermatogênese em condições normais auxiliando assim o testículo a produzir espermatozoides (BIGGIOGERA *et al.*, 1996; GRAD *et al.*, 2010; OHSAKO *et al.*, 1995). Wang *et al.* (2015), observaram um aumento nos níveis de mRNA dos genes da HSP90AA1 no testículo de frangos submetidos a estresse por calor agudo por 4 horas além de elevar a expressão de outras HSPs.

Além da HS90AA1 observou-se também a presença de várias outras HSPs no testículo de codornas. Essas proteínas possuem diferentes pesos moleculares de modo que as mais estudadas são as proteínas com peso molecular 60, 70, 90 e 110 kDa (KIANG; TSOKOS, 1998). Nesse trabalho, foram identificadas HSPs com diferentes pesos moleculares como a HSP-60 (HSPD1), HSP-70 (HSPA2; HSPA9 e HSPA8) e a HSP-90 (HSP90AA1; HSP90AB1 e HSP90B1). As *heat shock protein* (HSPs) são essenciais para a sobrevivência de proteínas expostas a um ambiente oxidativo (WELCH, 1992), deste modo, a presença dessas enzimas nos testículos de codornas resulta na diminuição dos danos relacionados ao estresse oxidativo e assim evitando danos sobre a fertilidade dos animais.

A HSP70 foi outra proteína encontrada no testículo de codornas. Ela se liga a proteínas não-ativas durante o estresse oxidativo (FINK, 1999), além de auxiliar no transporte de proteínas, através da membrana mitocondrial e a interação com receptores de esteroides (GABRIEL, 2001). De acordo com alguns estudos realizados com a HSP70 e os seus efeitos no organismo constatou-se que a aquisição de termotolerância está relacionada com o aumento dessa proteína (PARSELL; LINDQUIST, 1994). Quando os animais estão expostos a uma temperatura que ultrapassa a sua de tolera o calor, essas proteínas ativam-se protegendo assim o organismo contra os efeitos negativos dos ROS. Wang *et al.*, (1994) observaram um aumento significativo de HSP70 nos testículos de galos quando os mesmos eram expostos a uma temperatura de 41°C por 60 minutos.

Dentre as 155 proteínas encontradas no tecido testicular de codornas, observou-se também a presença de duas proteínas importantes para a proteção do organismo contra o ERO sendo elas a peroxiredoxin-6 e a superóxido dismutase [Cu-Zu], encontradas nas bandas 25 e 34 respectivamente. A peroxiredoxin-6 é pertencente a classe das peroxiredoxinas (PRDX), sendo consideradas as principais proteínas antioxidantes dos peróxidos produzidos endogenamente em eucariotas (HAN *et al.*, 2005). Segundo Han *et al.* (2005), foram constatados 5 tipos de diferentes proteínas de PRDX (PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4 e PRDX6) identificadas na linhagem evolutiva do frango (*Gallus gallus domesticus*). De acordo com esses mesmos autores, a partir de ensaios funcionais da PRDX em frangos, se observou que a atividade antioxidante dessas proteínas é similar a encontrada em mamíferos além de reforçar a ideia de que as PRDXs estão intimamente envolvidas na proteção e reparação de danos oxidantes.

Adicionalmente, Yuan *et al.* (2004) citam que as PRDX estão envolvidas na diferenciação e proliferação celular, nas respostas imunes e na apoptose. De acordo com a busca de sua ontologia gênica, essa é a primeira menção dessa proteína em tecidos de codorna, estando intimamente relacionada com a função antioxidante, protegendo os tecidos testiculares, diminuindo os riscos que o estresse oxidativo pode causar a fertilidade dos animais. Marzoni *et al.*, (2013) observou a presença da PRDX6 em sêmen de galo com peso molecular de 30 kDa, semelhante ao encontrado neste estudo.

A enzima superóxido dismutase [Cu-Zn] (SOD) é uma enzima presente no sistema de defesa do organismo e age na neutralização do excesso de ERO e desta forma previne danosa estrutura celular (ANDRADE *et al.*, 2010; LUZ *et al.*, 2011). Essa enzima é encontrada naturalmente no testículo de aves e age protegendo o testículo contra a peroxidação lipídica (RUTZ *et al.*, 2007). Sua função antioxidante é realizada quando catalisa a dismutação de duas moléculas do ânion superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG *et al.*, 2001; MAIA *et al.*, 2009). Também foi observado que a atividade do SOD em espermatozoides de peru possui menos atividade quando comparada a atividade em espermatozoides de galo (FROMAN *et al.*, 1981). Até então, não foi relatada a função bioquímica da SOD sobre os testículos de aves, mas já os efeitos bioquímicos sobre os testículos de mamíferos já estão bem elucidados. Segundo Mruk *et al.*, (2002), um baixo nível de SOD no testículo não somente tornaria o órgão susceptível a danos oxidativos, como também alteraria as funções testiculares específicas e resultaria na perda da homeostase.

Os resultados obtidos a partir da ontologia mostram que apenas 1% do total de proteínas possuem função antioxidante. Esse resultado é bem próximo ao relatado por

Słowińska *et al.* (2017), ao estudar sêmen de peru selvagem (*Meleagris gallopavo*), onde relatam que de 137 proteínas observadas, apenas 2% das proteínas encontradas no sêmen possuíam função antioxidante. A atividade antioxidante presente no testículo é de fundamental importância, pois a partir dessas enzimas ocorre uma proteção do mesmo contra fatores oxidativos que sem a presença dessas enzimas o testículo fica sujeito a danos que resultam em uma baixa fertilidade (SURAI, 2002).

Dentre essas proteínas, a peroxiredoxin-6 mostrou interação co-expressão com proteínas que protegem o organismo contra agentes oxidativos como a catalase, superoxide dismutase [Cu-Zn] e glutathione peroxidase (FIGURA 5A). A superoxide dismutase [Cu-Zn] mostrou interação textmining com outras proteínas capazes de extinguir radicais produzidos durante o estresse oxidativo como a catalase, thioredoxin e glutathione peroxidase (FIGURA 5B). A Glutathione peroxidase (GPX) foi uma enzima que mostrou ter interação com a SOD1 e a PRDX, atua no sistema de defesa contra ROS no organismo, presente no citossol e nas mitocôndrias das células. Possui várias formas isoenzimáticas e atua reduzindo o H₂O₂ em H₂O (NORDBERG *et al.*, 2001; BUSTAMANTE FILHO, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Surai *et al.* (1998), realizaram um estudo alimentando galos com vitamina E e selênio, e constataram que a GPX representou mais de 60% da atividade total presente no testículo. Quando os animais foram alimentados somente com vitamina E, a atividade do GPX no testículo foi insignificante. Constatou-se também, nesse estudo, que os animais alimentados com vitamina E, com a adição de selênio, apresentaram uma atividade aumentada da GPX no sêmen armazenado do que no fresco, indicando que a GPX juntamente com a suplementação com selênio aumenta a capacidade dessa enzima em proteger o espermatozoide da peroxidação lipídica, desta forma, protegendo as células contra danos oxidativos em sêmen congelado.

A Stress-70 protein (HSPA9) apresentou interação textmining com proteínas responsáveis por proteger outras proteínas do estresse oxidativo (60 kDa heat shock protein, mitochondrial e DnaJ homolog subfamily B member 6) como demonstra a figura 5C. A 60 kDa heat shock protein (HSPD1) foi encontrada também nesse estudo. Essa é considerada uma HSP60 e observou-se que essa proteína possui uma interação de co-expressão e textmining com a HSP70 de modo que ambas possuem características bioquímicas semelhantes (BECKER; CRAIG, 1994) (FIGURA 5D). Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8) também foi encontrada nesse estudo com interação interproteica co-expressão com HSP70 e proteína DJ-1 (Figura 5E).

6.3 Histologia

Por meio da microscopia óptica foi possível obter as imagens histológicas dos testículos e epidídimos de codornas alimentadas com anacardato de cálcio e assim observar se houve mudanças histológicas a partir do tratamento utilizado. Os túbulos seminíferos, na maioria dos animais, possuem diâmetro que varia de 150 a 300 μm (RAZI *et al.*, 2010). Nesse experimento, o menor e maior valor obtido para o diâmetro do túbulo seminífero foi de 183,5 μm e 221,3 μm respectivamente. Entretanto, os valores obtidos nos 4 tratamentos não sofreram influência de acordo com o nível de anacardato de cálcio utilizado nesse experimento. Observou-se diferença significativa de acordo com o nível de anacardato de cálcio para a altura do epitélio germinativo. A medida que o nível de anacardato de cálcio aumentava, o valor médio sofria redução. O tratamento controle obteve a maior média 71,2 μm valor esse próximo ao obtido no tratamento com 0,25% de anacardato de cálcio (70,1 μm). Porém, nos tratamentos 3 e 4 os valores médios obtidos foram de 41,2 e 45,6 μm , respectivamente. A partir da concentração de 0,50% de anacardato de cálcio, o epitélio germinativo sofria um encurtamento e isso pode estar relacionado a um processo espermático mais rápido. O epidídimo das aves é muito importante para o transporte de espermatozoides, na secreção e reabsorção dos fluidos e na remoção dos espermatozoides degenerados (FRANZO *et al.*, 2010). Nesse experimento houve uma grande diferença entre o tratamento controle (29,9 μm) e o tratamento com 0,75% de anacardato de cálcio (101,5 μm). Com o fornecimento de anacardato de cálcio nas concentrações de 0,25 e 0,50% houve um aumento do diâmetro do ducto epididimário quando comparado ao tratamento controle, porém, com a alimentação de codornas com 0,75% de anacardato de cálcio houve um maior aumento do diâmetro do ducto epididimário quando comparado os demais tratamentos utilizados resultando assim em uma maior capacidade do epidídimo de receber os espermatozoides oriundos do túbulo seminífero de modo que esses espermatozoides irão adquirir motilidade e assim participando da fertilização dos ovos, podendo assim aumentar a fertilidade desses animais.

Com relação a quantidade de células germinativas presentes no túbulo seminífero, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, porém é possível observar que há um aumento crescente na quantidade de células em todos os tratamentos. Esse efeito é algo esperado visto que a espermatogênese em aves é um processo complexo de proliferação celular, redução haploide e diferenciação celular, então durante esse processo é normal e esperado que haja um crescimento crescente das células germinativas (FROMAN *et al.*, 2004).

Analisando as imagens histológicas do testículo, observa-se a presença de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento, como espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides. É possível verificar também a presença de células de Leydig no espaço intersticial células essas responsáveis pela produção de andrógenos testiculares (LIU, *et al.*, 2014). As células de Sertoli também estão presentes no túbulo seminífero das cordões. Essas células têm como função regular o desenvolvimento das células germinativas, além de fornecer substratos energéticos como lactato e também hormônios (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Os ductos epididimário apresentam-se uniformes com grande presença de espermatozoides, bem como a observação dos ductos eferentes com células ciliadas e não ciliadas. Segundo Tingari *et al.* (1971), a maior parte do epidídimo é composta por ductos eferentes. Os ductos eferentes são ligados à rede testis e é onde há a transição dos espermatozoides para o lúmen epididimário sendo fundamentais para a absorção de fluídos (BEDFORD, 1978; AIRE, 1979).

7 CONCLUSÃO

A morfometria testicular das codornas não é alterada pelo valor de até 0,75% de anacardato de cálcio. A expressão de proteínas no testículo pode ser adequada pela adição de 0,75% de anacardato de cálcio, com destaque para proteínas relacionadas ao estresse oxidativo. A adição a partir de 0,50% de anacardato de cálcio modifica a altura do epitélio germinativo e o diâmetro do ducto epididimário, porém não resulta em efeitos no diâmetro do túbulo seminífero e nem na quantidade de células germinativas.

REFERÊNCIAS

- AIRE, T. A. The ductuli efferentes of the epididymal region of birds. **J. Anat.**, Great Britain, v. 130, n. 4, p. 707-723, 1979.
- AIRE, T. A. The epididymal region of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 70, p. 777-793, 2013.
- AUGHEY, E. FRERIC, F. L. **Comparative veterinary histology with clinical correlates**. 1st ed., England. Manson publishing / the veterinary press, 2011.
- ABREU, V. M. N.; ABREU, P. D. **Diagnóstico bioclimático para produção de aves na mesorregião Sul Baiano**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. 2003.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, USA, v. 18, p. 325-332, 2006.
- AMANN, R. P. Lessons for the poultry industry gleaned from experiences with other commodity species. **Poultry Science**, USA, v. 78, p. 419-427, 1999.
- AMOROSO, L. *et al.* Influência da espermatogênese e dos níveis de testosterona no aspecto reprodutivo de codornas. **R. Bras. Zootec.**, Minas Gerais, v. 37, n. 1, p. 61-66, 2008.
- AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. 1040p.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Paraná, v. 34, n. 2, p.79-85, 2010.
- AYYAGARI, V. Male reproductive system, semen collection methods and factors influencing semen production. **Proc 1st Natl Workshop Artif Insem Poultry**, Índia, p. 21-23. 1982.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARRETO, S.L.T. *et al.* Níveis de energia metabolizável para codornas japonesas na fase inicial de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 1, p. 79-85. 2007.
- BATISTA, E. *et al.* Avaliação nutricional da glicerina vegetal semipurificada para codornas de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 65, n. 6, p. 1783-1791, 2013.
- BECKER, J; CRAIG, E.A. Heat-shock proteins as molecular chaperones. **European Journal of Biochemistry**, California, v. 219, p.11-23, 1994.

BEDFORD, J. M. Influence of abdominal temperature on epididymal function in the rat and rabbit. **Am. J. Anat.**, v. 152, n.2, p. 509-22, 1978.

BENZIE, I. F. F. Lipid Peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s.l], v. 47, p. 233-261, 1996.

BERTECHINI, A.G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: UFLA, 2006. 301p.

BERTECHINI, A.G. **Nutrição de monogástrico**. Lavras: Editora UFLA, 2012.

BIGGIOGERA, M. *et al.* Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. **Experimental Cell Research**, Lausanne, v. 229, p.77-85, 1996.

BISWAS, A; MOHAN, J; SASTRY, K.V.H; TYAGI, J.S. Effect of dietary vitamin E on the cloacal gland, foam and semen characteristics of male japanese quail. **Theriogenology**, Bareilly, v. 67, p. 259-263, 2007.

BOTSOGLOU, N.A. *et al.* Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Thessaloniki, v. 45, p. 3711-3716, 1997.

BUSTAMANTE FILHO, I.C. **Estresse oxidativo na criopreservação de sêmen equino**. 2006. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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. **Analytical Chemistry**, Boston, v. 81, n. 23, p. 9819–9823, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, Georgia, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L.B.; MANSO, P. P. A. **Técnicas histológicas: conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; p. 89-188, 2010.

CONEGLIAN, S.M. *et al.* **Utilização de antioxidantes nas rações**. PUBVET, Londrina, v. 5, n. 5, Ed. 152, Art. 1026, 2011.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabolitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

COOKSEY, E. J.; ROTHWELL, B. The ultrastructure of the Sertoli cell and its differentiation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **J. Anat.**, Great Britain, v. 114, p. 329-345. 1973.

COOPER, T. G.; WAITES, G. M. H.; NIESCHLAG, E. The epididymis and male fertility. A symposium report. **Intern. J. Androl.**, Münster, v. 9, p. 81-90, 1986.

CHANG, G. et al. DNA methylation and NF-Y regulate Piwil1 expression during chicken spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**, Yangzhou, v. 162, p. 95-103, 2015.

CHEN, B; ZHONG, D; MONTEIRO, A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. **BMC Genomics**, Chongqing v.7, n. 156, p.1-16, 2006.

CHEN, R. *et al.* 2013. Cloning and expression characterization of the chicken Piwil1 gene. **Molecular Biology Reports**, Yangzhou, v. 40, p. 7083-7091, 2013.

CHERIAN, G. *et al.* Feeding dietary oils with tocopherols. Effects on internal qualities of eggs during storage. **Journal of Food Science**, Alberta, v. 61, p. 15-18, 1996.

CLULOW, J.; JONES, R.C. Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Newcastle, v. 64, p. 259-266, 1982.

DUCKER, E; XU, Z. Minimizing rancidity in muscle food. **Food Technology**, [s.1], v. 52, n. 10, p. 54-59. 1998.

EBEID, T.A. Organic selenium enhances ter antioxidative status and quality of cockerel semen high ambient temperature. **British Poultry Science**, Kafr El-Sheikh, v. 50, p. 641-647, 2009.

FRANZO, V.S.; VULCANI, V.A.S. Epidídimo e testículo de aves: **Revisão literária. PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 21, Ed. 126, Art. 852, 2010.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, F *et al.* Exigência de metionina + cistina total para codornas de corte durante a fase de crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 1, p. 120-126, 2012.

FINK, A.I. 1999. Chaperone-mediated protein folding. **Physiol. Rev.**, California, 79: 425-449.

FRAGOSO, J. S. *et al.* Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 4, p. 345-352, 2013.

FROMAN, D.P; THURSTON, R.J. Chicken and turkey spermatozoal superoxide dismutase: a comparative study. **Biology of Reproduction**, South Carolina, v. 24 p. 193, 2000.

FROMAN, D.P.; KIRBY J.D.; PROUDMAN, J.A. **Reprodução em aves: Macho e fêmea**. In: Hafez B. & Hafez E.S.E. (Eds), *Reprodução Animal*. 7ª ed., [s.1], p.237-257. 2004.

GONZALES, M.J.T.G. *et al.* Further alkyl and alkenylphenols of *Knema Laurina* and *Knema*

austrosiamensis: location of the double bond in the alkenyl side chains. **Phytochemistry**, Porto, v. 43, n. 6, p. 1333-1337, 1996.

GABRIEL, J.E. 2001. **Estudo da expressão temporal e especial de genes associados a miogênese durante o desenvolvimento embrionário de aves**. Tese (Doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 118 pp.

GONZÁLEZ-MORÁN, M. G. *et al.* Histological and sex steroid hormone receptor changes in testes of immature, mature, and aged chickens. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 35, p. 371-379, 2008.

GOÑI, I. *et al.* Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. **Poultry science**, Madrid, v. 86, p. 508-516, 2007.

GRAD, I. *et al.* The molecular chaperone Hsp90 α is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse. **Plos One**, Genève, v. 5, p. e15770, 2010.

GRAY, J. C. The anatomy of the male genital ducts in the fowl. **J. Morph.**, [s.l.], v. 60 p. 393-405, 1937.

HAN, J. Y. *et al.* Identification and Characterization of the Peroxiredoxin Gene Family in Chickens, **Poultry Science**, Seul, v. 84, p. 1432–1438, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 55-59, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 54-58, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. PPM 2017: **Produção da Pecuária Municipal 2017**. Rio de Janeiro, v. 45, p. 1-8, 2017.

ISLAM, K. M. S. Use of citric acid in broiler diets. **World's Poultry Science Journal**, Bangladesh v. 68, p. 104-118, 2012.

JORDÃO, J.F. **Estimativas das Exigências de Proteína e de Energia para Manutenção, Ganho e Produção de Ovos em Codornas**. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias José Jordão Filho, UFPB, Areia, 2008.

KARRE, L. *et al.* Review: Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, Zanjan, v. 93, p. 220-227. 2013.

KENAGY, G.J.; TROMBULAK, S.C. Size and function of mammalian testes in relation to body size. **Journal of Mammalogy**, Seattle, v. 67, p. 1-22, 1986.

KIANG, J.G., TSOKOS, G.C. 1998. Heat shock protein 70 Kda: Molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacol. Therapeut.**, Washington, 80: 183- 201.

KOBAYASHI, S.; OKAMOTO, S.; MATSUO, T. The influence of the foamy materials on the

fertilizing capacity of semen in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Agric Bull Saga University**, Bareilly, v. 32, p. 89–95, 1972.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S.S. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. **Indian Journal of Experimental Biology**, Ohio, v. 48, p. 425-435, 2010.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. *Klimate der Erde*. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928.

KUBO, I. et al. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, California, v. 99, p. 555-562, 2005.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J.H.P. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. **Chemical Reviews**, Middlesex v. 99, n. 1, p. 1-26, 1999.

KUEHNEL, W. **Color atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy**, 4th edition, New York, basic sciences, v. 601: p. 321-327, 2003.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. **J. Agric. Food Chemistry**, California, v. 41, p. 107-111, 1993.

KLEMM, R. D. et al. Gross and microscopic morphology of the glandula proctodealis (foam gland) of *Coturnix*. **Journal of Morphology**, New York, 141, p. 171-184, 1973.

LAKE, P.E. **Male genital organs - form and function in birds**. Vol.2. Academic Press, London, p. 1-61, 1981.

LANNA, L.L. **Morfologia testicular e reserva espermática na codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*)**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

LANNA, L.L.; SOARES, F.A.; SANTOS, T.M.; OLIVEIRA, J.N.; JUNIOR, M. A. P. Índice gonadossomático e correlações entre dimensões e peso testiculares na codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) aos 60 dias de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 955-960, 2013.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, 1995.

LIMA, C.A.A. et al. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-não-precose ccp-76 e ccp-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. **Ciência tecnologia animal**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 2000.

LIU, Q. et al. Toxicology in vitro zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear reception Nur77 expression. **Toxicology in vitro**, New York. v. 28, n. 4, p. 647-656, 2014.

LUZ, H.K.M.; WANDERLEY, L.S.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; FIGUEREDO, J.R.;

- RODRIGUES, A.P.R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 956-969, 2011.
- LUBIC, M.; THACHIL, E.T. Copolymerization of cashew nut shell liquid (CNSL) and phenol by condensation with hexamine. **International Journal of Polymeric Materials**, [s. l], v. 52, p. 793-807, 2003.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Natal, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.
- MACHLIN, L.J. & BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J.** 1 ed., New Jersey, p. 441-445, 1987.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. **Springer-Verlag**, New York. p. 495. 1981.
- MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família Lamiales. Aplicação em produtos alimentícios. **Braslian Journal of Food tecnology**, Campinas, v. 10, p. 96-103. 2007.
- MATOS, J.E.X. *et al.* Solventes para extração do liquido da castanha de caju e compatibilidade ambiental. **Revista Tecnologia de Fortaleza**, Fortaleza, v. 29, n. 1, p. 101-109, 1998.
- MARZONI M., CASTILLO A., SAGONA S., CITTI L., ROCCHICCIOLI S., ROMBOLI I., FELICOLI A. A proteomic approach to identify seminal plasma proteins in roosters (*Gallus gallus domesticus*). **Animal Reproduction and Science**, Pisa, v. 140, p. 216–223, 2013.
- MILTENBURG, G. Tendencia futura del uso de aditivos en nutrición aviar. **Revista Avicultura Profesional**, [s. l], v. 17, p. 33-35, 1999.
- MOLLER, A. P. Sperm competition, sperm, paternal care, and relative testis size in birds. **The American Naturalist**, Uppsala, v. 137, p. 892-906, 1991.
- McFARLAND, L. Z. *et al.* The cloacal gland complex of Japanese quail. **Experientia**, Basel, v. 15, p. 941, 1968.
- MRUK, D.D; SILVESTRINI, B; MO, M; CHENG, Y.C. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. **Contraception**, New York, v. 65, p. 305–311, 2002.
- NARASIMHAN, B; PANGHAL, A.; SINGH, N.; DHAKE. A.S. Efficiency of anacardic acid preservative in tomato products. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hisar, v. 32, n. 4, p. 600-609, 2008.
- NEZHAD, Y. E.; SHIVAZAD, M.; NAZEERADL, M.; BABAK, M. M. S. Influence of citric acid and microbial phytase on performance and phytate utilization in broiler chicks

fed a corn, soybean meal diet. **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine**, Shabestar, v. 61, p. 407-413, 2007.

NORDBERG, J; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, Stockholm, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NUNES, C.S.; CINSA, L.A. Princípios do processamento histológico de retina. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais.**, [s. l], v.8, n. único, p. 21-40, 2016.

O'BRIEN, T.; FEDER, N.; MCCULLY, M. Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, Cambridge, v. 59, p. 367-373, 1964.

OLIVEIRA, P.F. *et al.* Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolic-associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 1820, p. 84-89, 2012.

OGAWA, K.; NAKAMISHI, Y.; TOJO, H.; IMANISHI, M. Effect of frothy fluid from cloacal gland on fertility in J. Quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Bull Facul Agrice Kagoshima Univ.**, Vancouver, v. 24, p. 35-40. 1974.

OGITA, A., FUJITA, K. I., TANAKA, T. Salinomycin and citric acid in combination demonstrate bactericidal activity against Gram-negative bacteria. **Ann. Microbiol.**, Osaka, p. 59, 2009.

OHSAKO, S; BUNICK, D; HAYASHI, Y. Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Illinois, v. 43, p. 67-76, 1995.

ORSI, A. M. *et al.* Estrutura microscópica do complex tubular: rede testicular e ductos excretorios proximais do testículo em codorna doméstica (*Coturnix coturnix*). **Veterinária Notícias**, Uberlandia, v. 13, n. 1, p. 17-29, 2007.

ORSI, A.M.; STEFANINI, M.A.; VIEGAS, K.A.S. *et al.* Aspectos morfológicos do ciclo testicular anual de codorna doméstica (*Coturnix coturnix*) da variedade italiana. **Brazilian Journal of Veterinary Research. And Animal. Science**, Botucatu, v. 42, p. 163-170, 2005.

PARSELL, D.A.; LINDQUIST, S. Heat shock proteins and stress tolerance. In: Morimoto, R.I., Tissières, A. and Georgopoulos, C. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. New York. p. 457-494. 1994.

PASQUETTI, T.J. **Avaliação nutricional da glicerina bruta ou semipurificada, oriundas de gordura animal e óleo vegetal, para codornas de corte**. 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

PASTORE, N. S.; SALAH, M. H.; ZEMPUSLKI, D. A. Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus Niger*: Avaliação de Diferentes Fontes de Nitrogênio e de Concentração de Sacarose. **Engevista**, Paraná, v. 13, n. 3, p.149-159, 2011.

PASTORE, S.M.; OLIVEIRA, W.P. de; Muniz, J.C.L. Panorama da coturnicultura no Brasil. **Revista eletrônica nutritime**, Minas Gerais, v. 9, n. 6, p. 2041–2049, Nov./Dez.2012.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N; GORDON, M. (edit.) **Antioxidants in Food: practical applications**. Northern Ireland, Boca Raton: CRC Press, 2001. 380p.

PIMENTEL, C.; V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.

PINHEIRO, S.K.P. **Ontogênese e mecanismo de secreção em coléteres de *Morinda citrifolia* L. (rubiaceae)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PINTO, P.; FERREIRA, A.S.; DONZELE, J. L; SILVA, M. A.; SOARES, R.T.R.N; CUSTÓDIO, G.S.; PENA, K.S. Exigência de Lisina para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa v. 32, n. 5, p. 1182-1189, 2003.

PIRES, M.F.A.; FERREIRA, A.M.; COELHO, S.G. Estresse calórico em bovinos de leite. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO E NUTRIÇÃO DE GADO LEITEIRO, Belo Horizonte, 1998. **Anais...** Belo Horizonte, 1998. p. 17-30.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, 755-760, 2006.

RAFECAS, M. *et al.* Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. **J. Chromatogr**, Barcelona, v. 822 p. 305 –309. 1998.

RAZI, M. *et al.* Histological and anatomical study of the White Rooster of testis, epididymis and ductus deferens. **Int.J.Vet.Res.**, Urmia, v. 4, n. 4, p. 229-236. 2010.

REIS, L. F. S. D. **Codornizes – criação e exploração**. 1. ed., Lisboa: Arte Final, 1979. 222p.

ROOVERS, E. F. *et al.* Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos. **Cell Reports**, Germany, v. 10, p. 2069-2089, 2015.

Resolução Normativa 25, de 29 de setembro de 2015 do **Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal (CONCEA)**.

RICHEIMER, S.; BERNART, M.; KING, G.; KENT, C.; BAILEY, D. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. **Journal of the American Chemical Society**, Tennessee, v. 73, p. 507-514, 1996.

RUTZ, F.; ANCIUTTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. 2007. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Pelotas, v. 31. 3:307-317.

RUTZ, Z. **Uso de antioxidantes na ração e subprodutos**. In: Conferência APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1994, Campinas: FACTA, 1994, p.73-84.

- SAALU, L.C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Makurdi, v. 13, n. 9, p.413-422, 2010.
- SANTOS, C.T.; MURAKAMI, E.A.; OLIVEIRA, L.A.; COSTA, D.P. Desenvolvimento corporal e testicular em machos de codornas de corte e de postura de 25 a 360 dias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 11, p. 1205-1212, 2012.
- SIOPEL, T. D.; WILSON, W. O. The cloacal gland – an external indicator of testicular development in Coturnix. **Poultry Science**, Champaign, v. 54, p. 1225-1229, 1975.
- SILVA, J. H. V. Tabelas para codornas Japonesas e Européias. **FUNEP**, Jaboticabal-SP, 2ª edição, p. 107, 2009.
- SINHA, A; GUPTA, S. Lipid peroxidation and its impact on infertility. **Scient open access journal**, Ohio, v. 4, p. 1-10, 2018.
- SINGH, R.P. *et al.* Role of cloacal foam in natural mating in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **World Poultry Sci J.**, Izatnagar, v. 64, p. 336. 2008.
- SINGH, R. P. *et al.* Cloacal gland foam enhances motility and disaggregation of spermatozoa in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 75, n. 3 p. 563-569, 2011.
- SURAI, P.F. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. **Nottingham University Press**, 1ª ed. United Kingdom, Nottingham, 2002, p. 615.
- SURAI, P.F. Natural antioxidants in Poultry nutrition: New developments In: 16TH European Symposium on Poultry Nutrition, England, p. 669-675, 2006.
- STOLL, R.; MARAUD, A. Sur la constitution de l'epididyme du coq. **Compte Rendu des Séances de la Société de Biologie**, [s.l], v. 49, p. 687-689, 1955.
- SŁOWIŃSKA, M; NYNCA, J; ARNOLD, G.J; FRÖHLICH, T; JANKOWSKI, J; KOZŁOWSKI, K; MOSTEK, A; CIERESZKO, A. Proteomic identification of turkey (*Meleagris gallopavo*) seminal plasma proteins, **Poultry Science**, Olsztyn, v. 96, p. 3422–3435, 2017.
- TOYOMIZU, M. *et al.* Uncoupling effect of anacardic acids from cashew nut shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. **Life science**, Sendai, v. 66, n. 3, p. 229-234, 2000.
- SHIL, S.K. *et al.* Histological and Morphometric Analysis of Testes of Adult Quail (*Coturnix coturnix japonica*) of Bangladesh. **Int. J. Morphol.**, Bangladesh, 33(1):100-104, 2015.
- SHREVE, R.N.; BRINK, J.A. **Indústria de processos químicos**. 4ª ed. Trad. H. Macedo. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1980. p. 242, 400, 483-484, 544, 689.

SWENSON, M. J.; REECE, W. **Fisiologia dos Animais Domésticos** - Dukes, 10º ed., [s.l], 2001.

TANAKA, S.; YASUDA, M. Histological changes in the testis of the domestic fowl after adenohipophysectomy. **Poult. Sci.**, Nagoya, v. 59 n. 7, p. 1538-1545, 1980.

TAWFEEK, S.S. *et al.* The effect of Dietary Supplementation of Some Antioxidants on Performance, Oxidative Stress, and Blood Parameters in broilers under natural summer conditions. **Journal World's Poultry Research**, Beni Suef, v. 4, p. 10-19. 2014.

TINGARI, M. D; LAKE, P. E. Uptake of spermatozoa by the ductuli efferentes after ligation of the ductus deferens of the domestic fowl. **J. Anat.**, [s.l], v. 109, p. 353-354, 1971.

TOYOMIZU, M.; NAKAI, Y.; NAKATSU, T.; AKIBA, Y. Inhibitory effect of dietary anacardic acid supplementation on cecal lesion formation following chicken coccidial infection. **Animal Science Journal**, Sendai, v. 74, n. 2, p. 105-109, 2003.

TREVISAN, M.T.S. *et al.* Characterization of alkyl phenols in Cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical technology**, Heidelberg, v. 4, p. 99-197, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L; GOULART, M.O.F; MOURA, J.B.F; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, Maceió, v.30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VIEIRA, T.S. **Estudos visando à síntese de novos derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer**. 2007. 89 f. Dissertação (mestrado em química) – Universidade de Brasília, Brasília.

WANG, D.; GIRARD, J. T.; KASTEN, P. T.; LACHANCE, M. R; MILLER-WIDEMAN, A. M.; DURLEY, C. R. Inhibitory activity of unsaturated fatty acids and anacardic acids toward soluble tissue factor-factor viia complex. **Journal of Natural Products**, Missouri, v. 62, p. 1352-1355, 1998.

WANG, S. H. *et al.* Acute Heat Stress Induces Differential Gene Expressions in the Testes of a Broiler-Type Strain of Taiwan Country Chickens, **Plos One**, Taichung, p.1-14, 2015.

WANG, Z.G.; PAN, X.J.; PENG, Z.Q.; ZHAO, R.Q.; ZHON, G.H. Methionine and selenium yeast supplementation in maternal diets affects color, water holding capacity and oxidative stability of the male offspring meat at the early stage. **Poultry Science**, Nanjing, v. 88, p. 1096 –1101, 2009.

WELCH, Y. J (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiol Rev.**, California, 72:1063–1080

WILEY, R.C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. New York: Chapman & Hall, 1994, p. 286.

YUAN, J. *et al.* Overexpression of antioxidant enzyme peroxiredoxin5 protects human tendon

cells against apoptosis and loss of cellular function. **Biochimica et Biophysica Acta**, Sydney, v. 1693, n.1, p.37-45, 2004.

ANEXO A - TABELA 3 - PROTEÍNAS DO TECIDO TESTICULAR DE CODORNAS EUROPEIAS. AS PROTEÍNAS FORAM SEPARADAS POR ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE) E IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ESI-Q-TOF) IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS NO TECIDO TESTICULAR DE CODORNAS EUROPEIAS ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ÁCIDO ANACÁRDICO.

Band	Protein	Gene names	Accession number		MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	m/z	z
1	PREDICTED: clathrin heavy chain 1 isoform X1	CLTC	XP_015735950.1	^a	71	0	(1216)LLYNNVSNFGR(1226)	71	648.8392	2
2	PREDICTED: cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1		XP_003202093.1	^a	50	0	(607)AMTLIAGSPLK(617)	50	559.3221	2
	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	ATG7	XP_024999761.1	^a	33	4	(128)LAELNAYVGVSSSR(141)	33	473.4000	2
3	PREDICTED: ATP-citrate synthase isoform X1	ACLY	XP_015741119.1	^a	175	2	(89)GQETTIANAK(99)	82	573.3089	2
							(663)SGGMSNELNNIISR(676)	93	754.3613	2
	PREDICTED: DNA damage-binding protein 1	DDB1	XP_015718677.1	^a	72	0	(629)VTLGTQPTVLR(639)	74	592.8497	2
	PREDICTED: ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	ATG7	XP_015706618.1	^a	75	7	(63)MQTSNVLVSGLR(74)	75	660.8475	2
4	PREDICTED: ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	N329_12388	XP_010571447.1	^a	190	2	(68)MQTSNVLVSGLR(79)	98	660.8478	2
							(586)KPLLESGTLGTR(597)	91	622.3616	2
5	PREDICTED: alpha-actinin-1-like endoplasmic precursor	ACTN1	XP_015720226.1	^a	97	3	(174)TINEVENQILTR(185)	97	715.3821	2
		HSP90B1	NP_001310126.1	^a	74	1	(75)FAFQAEVNR(83)	74	541.2708	2
	PREDICTED: heat shock 70 kDa protein 4L	HSPA8	XP_015716789.1	^a	74	1	(111)LFAVEQITGMLLAK(124)	74	775.4452	2
	PREDICTED: heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	XP_005439121.1	^a	72	1	(83)TLTLVDTGIGMTK(85)	75	675.3693	2
	PREDICTED: hexokinase-3 isoform X1	HK3	XP_015731713.1	^a	253	3	(269)DVVQLLQAAISR(280)	82	658.8813	2
							(381)LVGSVYLGEIVR(392)	87	652.8768	2
							(982)GAALVAHVSR(992)	85	525.7814	2
							(982)GAALVAHVSR(992)	85	526.3007	2
	PREDICTED: puromycin-sensitive aminopeptidase	N/A	XP_015741316.1	^a	89	1	(539)LGLQNDLFSLAR(550)	89	673.8649	2
	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	AAES_6488	KQK82914.1	^a	86	0	(1054)WALSQSNPSALR(1064)	86	665.3446	2
		7								
6	heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	NP_001310167.1	^a	114	1	(387)GVVDSEDIPLNLSR(400)	114	757.3970	2
							(387)GVVDSEDIPLNLSR(400)	96	757.3970	2

	heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	NP_001310124.1	^a	470	8	(209)HSQFIGYPIR(218)	82	609.3186	2
							(311)SLTNDWEDHLAVK(323)	112	764.3771	2
							(324)HFSVEGQLEFR(334)	76	674.8321	2
							(383)GVVDSDELPLNISR(396)	114	757.3970	2
							(383)GVVDSDELPLNISR(396)	96	757.3970	2
							(461)YYTSASGDEMVSLLK(474)	94	783.8508	2
	piwi-like protein 1	PIWIL1	ADK95114.1	^a	94	1	(507)NYDAANTLLQNLFK(520)	84	812.9166	2
	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	AAES_6488	KQK82914.1	^a	91	0	(878)LAGESESNLR(887)	91	538.2697	2
7	PREDICTED: heat shock protein 75 kDa, mitochondrial isoform X2	HSPA9	XP_015732760.1	^a	100	1	(387)GVVDSEDIPLNLSR(400)	100	757.3993	2
	heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	NP_001310124.1	^a	187	5	(87)TLTIVDTGIGMTKADLVNN	97	859.1378	3
							LGTIK(111)	100	757.3993	2
8	PREDICTED: heat shock 70 kDa protein	HSPA8	XP_010150685.1	^a	394	10	(383)GVVDSDELPLNISR(396)			
							(5)GPAVGIDLGTYSYCVGVFQH	85	755.0450	3
							GK(26)	75	822.9202	2
							(114)TFPPEISSMVLTK(127)	71	830.4562	2
							(173)IINEPTAAAIAYGLDK(188)	81	830.4591	2
							(173)IINEPTAAAIAYGLDK(188)	71	894.5104	2
							(173)IINEPTAAAIAYGLDKK(188)	81	728.9160	2
	heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	NP_001310129.1	^a	486	13	(332)GQIQEIVLVGGSTR(345)			
							(4)GPAVGIDLGTYSYCVGVFQH	85	755.0450	3
							GK(25)	86	833.4046	2
							(57)NQVAMNPTNTVFDK(71)	72	833.4048	2
							(57)NQVAMNPTNTVFDK(71)	86	541.9496	3
							(89)HWPFTVVNDAGRPK(102)	76	991.5153	2
							(138)TVTNAVVTVPAYFNDSQR(155)	71	830.4562	2
							(172)IINEPTAAAIAYGLDK(187)	81	830.4591	2
							(172)IINEPTAAAIAYGLDK(187)	71	894.5104	2
							(172)IINEPTAAAIAYGLDKK(188)			
	PREDICTED: serum albumin	ALB	XP_015717009.1	^a	167	4	(48)AVAMITFAQYLQR(60)	72	764.4096	2
							(160)VSFLGHFIYSVAR(172)	99	748.4135	2
	PREDICTED: stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	XP_015731683.1	^a	173	4	LYSPSQIGAFVLMK	91	785.4309	2
							LLGQFTLVGIPPAPR	82	789.9810	2
9	PREDICTED: bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	XP_015723469.1	^a	76	1	(125)IDIGGVALLR(134)	76	513.8188	2

	PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L, partial	EIF3D	XP_010154288.1	^a	81	1	(121)VSGGPTLEQR(130)	83	522.2852	2
	PREDICTED: heat shock 70 kDa protein 4L isoform X3	N306_07292	XP_009944044.1	^a	88	1	(129)VLATTFDFPFIGGR(141)	88	697.3815	2
	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	HSP90AA1	BAI23210.1	^a	88	1	(461)YYTSASGDEMVSLLK(474)	82	783.8612	2
	inducible heat shock protein 70	N/A	ACC85671.1	^a	77	2	(38)TTPSYVAFTDTER(50)	77	744.3589	2
	PREDICTED: serum albumin	ALB	XP_015717009.1	^a	79	2	(48)AVAMITFAQYLQR(60)	81	764.4085	2
10	heat shock protein 70kDa	HSPA2	BAF37039.1	^a	81	2	(38)TTPSYVAFTDTER(50)	81	744.3629	2
	PREDICTED: pyruvate kinase PKM isoform X1	PKM	XP_015727855.1	^a	405	11	(32)LDIDSEPTIAR(42)	77	615.3253	2
							(125)GSGTAEVELKK(135)	82	559.8095	2
							(230)FGVEQNVDMVFASFIR(245)	84	625.6403	2
							(383)EAEAAMFHR(391)	85	539.2463	2
							(406)EPADAMAAGAVEASF(421)	78	790.8749	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	XP_015739782.1	^a	98	2	(439)AVAQALEVIPR(449)	98	583.8518	2
11	PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase	GPI	XP_015729552.1	^a	154	5	(211)TFTTQETITNAVAK(225)	82	813.4288	2
							(423)ILLANFLAQTEALMK(437)	74	846.4818	2
	PREDICTED: protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	XP_015728935.1	^a	166	5	(63)LAPEYEAAAATR(73)	79	596.3029	2
							(131)QAGPASVALSSVADFEK(147)	87	838.9376	2
	PREDICTED: retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	XP_015704634.1	^a	253	8	(109)LTLATMEAIDGGK(121)	79	668.3496	2
							(152)TVPMDGNFFTFTR(164)	76	774.8727	2
							(429)ANNTTYGLAAAVFTK(443)	98	771.4078	2
	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: T-complex protein 1 subunit alpha	CCT4	XP_015713526.1	^a	88	2	(22)TQNVTAASAIAIVK(36)	88	750.9299	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit theta isoform X1	CCT8	XP_015736432.1	^a	160	4	(282)AIADSGANVVVTGGK(296)	84	679.8680	2
							(441)FAEAFEAIIPR(450)	76	575.7991	2
12	PREDICTED: 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	XP_015723158.1	^a	77	3	(251)ISSVQSIVPALEIANSR(268)	77	641.0191	3
	PREDICTED: retinal dehydrogenase 1	ALDH1A2	XP_015704634.1	^a	93	2	(429)ANNTTYGLAAAVFTK(443)	93	771.4064	2
	ruvB-like 1	RCJMB04_28a17	NP_001006138.1	^a	101	3	(318)ALESSISPIVIFASNR(333)	101	852.4755	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit theta isoform X1	CCT8	XP_015736432.1	^a	92	2	(282)AIADSGANVVVTGGK(296)	92	679.8735	2
	PREDICTED: tubulin alpha-4A chain isoform X1		XP_015724463.1	^a	77	2	(281)LIGQIVSSITASLR(294)	77	729.4388	2

	PREDICTED: tubulin alpha-8 chain	N/A	XP_015740341.1	^a	77	3	(215)LIGQIVSSITASLR(228)	77	729.4388	2
	PREDICTED: tubulin beta chain	TUBB4B	XP_015706308.1	^a	418	21	(6)SGPFGQIFRPDNFVFGQSGA GNNWAK(31)	75 78	933.4517	3 2
							(91)IMNTFSVVPSPK(102)	87	908.7871	3
							(145)LTPTYGDLNHLVSATMS GVTTCLR(169)	87 91	937.4788	2 3
							(291)MSATFIGNSTAIQELFK(307) (291)MSATFIGNSTAIQELFKR(3 08)			
13	PREDICTED: adenosylhomocysteinase	AHCYL1	XP_015736869.1	^a	74	2	(176)VPAINVNDVTK(187)	74	628.8489	2
	PREDICTED: alpha-enolase isoform X1	ENO1	XP_015738218.1	^a	383	13	(16)GNPTVEVDVYTNK(28)	78	718.3589	2
							(163)LAMQEFMILPVGASSFK(1 79)	92 110	950.9882	2 2
							(240)VVIGMDVAASEFYR(253)	102	817.4188	2
	eukaryotic initiation factor 4A-II	EIF4A2	NP_989880.1	^a	150	7	(344)VNQIGSVTESLQACK(358)			
							(70)GYDVIAQAQSGTGK(83)	76	697.8532	2
							(148)LQAEAPHIVVGTGPR(162)	74	772.9360	2
	PREDICTED: tubulin beta chain	TUBB4B	XP_015706308.1	^a	334	17	(91)IMNTFSVVPSPK(102)	81	668.3563	2
							(145)LTPTYGDLNHLVSATMS GVTTCLR(169)	96 78	908.7867	3 2
							(181)LAVNMVFPFR(191)	79	580.3173	2
							(291)MSATFIGNSTAIQELFK(307)		937.4789	2
	PREDICTED: tubulin beta-3 chain	N/A	XP_015729712.1	^a	332	7	(583)IMNTFSVVPSPK(594)	81	668.3563	2
							(637)LTPTYGDLNHLVSATMS GVTTCLR(661)	96 78	908.7867	3 2
							(673)LAVNMVFPFR(682)	79	580.3173	2
							(783)MSATFIGNSTAIQELFK(789)		937.4789	2
14	PREDICTED: actin, cytoplasmic 1	KDR	XP_015732105.1	^a	75	2	(29)AVFPSIVGRPR(39)	77	599.8603	2
	LOW QUALITY PROTEIN: alpha-centractin	AAES_12 9494	XP_023785541.1	^a	171	8	(47)VMAGALEGDIFIGPK(61)	84	767.4163	2
							(293)TLFSNIVLSGGSTLTK(308)	87	842.4752	2
	beta-actin, partial	N/A	AAF13710.1	^a	75	3	(8)AVFPSIVGRPR(18)	77	599.8603	2
	PREDICTED: long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial		XP_015723434.1	^a	78	3	(78)AGQQGLLGVAIAEK(107)	78	677.8937	2

	PREDICTED: tubulin alpha-3 chain	N/A	XP_015727678.1	^a	167	6	(216)NLDIERPTYTNLNR(229) (230)LIGQIVSSITASLR(243)	85 83	573.6298 729.4414	3 2
15	PREDICTED: 40S ribosomal protein SA	RPSA	XP_009999990.1	^a	266	15	(64)AIVAIENPADVSVISSR(80) (90)FAAATGATPIAGR(102) (103)FTPGTFTNQIQA AFR(117)	77 88 101	870.9827 602.3286 849.9354	2 2 2
	PREDICTED: alpha-enolase isoform X1	ENO1	XP_015738218.1	^a	74	3	(240)VVIGMDVAASEFYR(253)	74	786.8980	2
	PREDICTED: aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	XP_015729073.1	^a	87	3	(119)YVTVQGISGTGSLR(132)	89	719.3927	2
	PREDICTED: enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial isoform X1		XP_015710037.1	^a	100	3	(118)LVSSLVSAESAVQK(131)	100	709.3995	2
	PREDICTED: gamma-enolase isoform X2	ENO2	XP_015728224.1	^a	74	3	(240)VVIGMDVAASEFYR(253)	74	786.8980	2
	PREDICTED: tubulin alpha-1C chain		XP_015742375.1	^a	93	3	(216)NLDIERPTYTNLNR(229)	93	573.6297	3
16	PREDICTED: desmin	DES	XP_015724646.1	^a	78	2	(388)LALDIEIATYR(398)	78	639.3552	2
	PREDICTED: leucine zipper transcription factor-like protein 1	N/A	XP_015709640.1	^a	164	9	(138)LAPINEGESELLNK(151) (169)TIETQATAALDEK(181)	86 77	763.9097 695.8533	2 2
	PREDICTED: protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 isoform X1	PPP1R7	XP_015726561.1	^a	89	2	(340)IEGLQSLVNLNR(350)	89	621.3622	2
17	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	^a	307	15	(65)LVINGNAITIFQER(78) (65)LVINGNAITIFQER(78) (161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAI TATQK(184) (161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAI TATQK(184) (161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAI TATQK(184) (233)VPTPNVSVVDLTCR(246) (233)VPTPNVSVVDLTCR(246)	80 80 78 120 111 106 108	794.4468 794.9444 653.5869 871.1222 871.1224 778.9113 778.9136	2 2 4 3 3 2 2
	PREDICTED: leucine zipper transcription factor-like protein 1	N/A	XP_015709640.1	^a	247	11	(128)KPNAELIKPK(137) (138)LAPINEGESELLNK(152) (262)KFQQTAAYR(270)	70 94 83	379.8971 763.9112 556.7965	2 2 2
	PREDICTED: malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	XP_015712071.1	^a	154	9	(48)VLVTGAAGQIAYSLLYSIAK (67) (167)VVVVGNPANTNCLIASK(183)	76 79	1019.581 9	2 2
	PREDICTED: protein disulfide-isomerase A6	AAES_1298 24	XP_015714908.1	^a	82	3	(223)LAAVDATVNQMLASR(237) (223)LAAVDATVNQMLASR(237)	82 78	780.4155 788.4127	2 2
18	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	XP_015733447.1	^a	86	9	(267)AFLADPSAFVAAAPVVTE	86	923.1642	3

						TAAPAAAAAPAK(296)			
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: aldose reductase-related protein 1-like	AV530_009719	XP_015720325.1	a	122	22	(23)SPPGQVTAAVMAAIDAGYR	73	630.9796	2
						(41)	122	945.9779	2
PREDICTED: F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAPZA2	XP_015709129.1	a	156	7	(65)LLLNNNDNLLR(74)	77	599.3503	2
						(206)FTISPSTTQVAGILK(220)	79	781.9471	2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	a	163	11	(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAI	83	653.5871	4
						TATQK(184)	83	871.1256	3
						(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAI	80	778.9072	2
PREDICTED: glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	CTBP2	XP_015705574.1	a	81	4	(233)VPTPNVSVVDLTCR(246)	81	816.4471	2
						(301)STMAVLAADNLLAGLR(316)			
PREDICTED: leucine zipper transcription factor-like protein 1	N/A	XP_015709640.1	a	72	4	(169)TIETQATAALDEK(181)	72	695.8591	2
PREDICTED: malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	XP_015712071.1	a	318	18	(48)VLVTGAAGQIAYSLLYSIAK	76	1019.586	2
						(67)	73	5	2
						(108)EVIPTDKKEEVAFK(120)	93	752.9024	2
						(167)VVVVGNPANTNCLIASK(183)	76	878.4757	3
						(221)NVIIWGNHSSTQYPDVNHAK(240)		760.7101	
PREDICTED: nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	AAES_69056	XP_015742550.1	a	186	9	(101)NILFVITKPDVYK(113)	74	775.4572	2
						(114)SPASDTYIVFGEAK(127)	112	742.8696	2
PREDICTED: nuclease-sensitive element-binding protein 1 isoform X1	YBX1	XP_015737879.1	a	74	5	(117)GAEAANVTGPGGVPVQGSK(135)	74	848.4360	2
PREDICTED: ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 isoform X2	PRPS2	XP_015715595.1	a	73	6	(186)VYAILTHGIFSGPAISR(202)	73	601.3344	3
19 elongation factor 1-alpha, partial	EF1A	AJP09268.1	a	75	4	(110)IGGIGTVPVGR(120)	75	513.3057	2
PREDICTED: hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	AAES_156447	XP_015716844.1	a	78	8	(138)FAPEHTIFASNTSSLQITQLANSTTR(163)	78	945.8050	3
PREDICTED: L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	XP_015724692.1	a	271	11	(119)LKGEMMDLQHGSFLQTHK(137)	72	749.0367	3
						(138)IVADKDYAVTANSK(151)	113	747.8944	2
						(219)VIGSGCNLDSAR(230)	86	624.8006	2

	PREDICTED: malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH1	XP_015736217.1	^a	255	16	(26)VAVLGASGGIGQPLSLLLK(44)	91	897.0472	2
							(52)LTLYDIAHTPGVAADLSHIE TR(73)	79	599.0584	4
							(52)LTLYDIAHTPGVAADLSHIE TR(73)	77	798.4217	4
							(241)AGAGSATLSMAYAGAR(256)	85	735.8523	2
	PREDICTED: ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 isoform X2	PRPS2	XP_015715595.1	^a	86	6	(186)VYAILTHGIFSGPAIR(202)	86	601.3322	3
	PREDICTED: S-formylglutathione hydrolase isoform X1	ESD	XP_015707271.1	^a	82	4	(131)LINANFPTNPER(142)	82	693.3601	2
	PREDICTED: tubulin beta chain	TUBB4B	XP_015706308.1	^a	82	2	(181)LAVNMVPFPR(190)	82	580.3172	2
	PREDICTED: UPF0769 protein C21orf59 homolog		XP_003202943.1	^a	78	3	(24)LAELAPLVAR(33)	78	526.8258	2
20	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	XP_015724692.1	^a	81	3	(219)VIGSGCNLDSAR(230)	81	624.8006	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	XP_015739782.1	^a	78	2	(439)AVAQALEVIPR(449)	78	583.8463	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit theta isoform X1	CCT8	XP_015736432.1	^a	179	4	(282)AIADSGANVVVTGGK(296)	96	679.8655	2
							(510)LATNAAVTVLR(520)	83	564.8373	2
	PREDICTED: tubulin alpha-8 chain	N/A	XP_015740341.1	^a	71	3	(215)LIGQIVSSITASLR(228)	71	729.4359	2
21	PREDICTED: proteasome assembly chaperone 1 isoform X1	PSMG1	XP_015738121.1	^a	89	4	(171)TQESTLTLPSFLK(184)	89	781.4274	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	XP_015739782.1	^a	154	4	(439)AVAQALEVIPR(449)	78	583.8492	2
							(508)TAVETAVLLLR(518)	78	593.3637	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit theta isoform X1	CCT8	XP_015736432.1	^a	259	6	(282)AIADSGANVVVTGGK(296)	89	679.8650	2
							(441)FAEAFEAIIPR(450)	89	575.7988	2
							(510)LATNAAVTVLR(520)	81	564.8379	2
	PREDICTED: tubulin alpha-3 chain	N/A	XP_015727678.1	^a	74	3	(230)LIGQIVSSITASLR(243)	73	729.4351	2
							(230)LIGQIVSSITASLR(243)	74	729.4359	2
	UPF0769 protein C21orf59 homolog	C1H21ORF59	NP_001006258.1	^a	71	3	(24)LAELAPLVAR(33)	71	526.8272	2
	PREDICTED: voltage-dependent anion-selective channel protein 2 isoform X2	AAES_208041	XP_015722112.1	^a	84	7	(237)VNNSSLVGLGYTQTLRPGVK(256)	84	701.7223	3
22	Proteasome subunit alpha type-3, partial	Z169_11543	KFP16057.1	^a	77	5	(23)AVENSSTAIGIR(34)	77	603.3268	2
	PREDICTED: tubulin beta-1 chain isoform X2	N/A	XP_015737231.1	^a	91	3	(91)IMNTFSVVPSPK(102)	81	668.3499	2
23	PREDICTED: 60S ribosomal protein L7	RPL7	XP_015711270.1	^a	98	4	(165)IALTDNSLIR(174)	98	558.3220	2
							(165)IALTDNSLIR(174)	77	558.3220	2

	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H isoform X7	HNRNPH2	XP_015731198.1	^a	73	1	(66)ILNGPLGIR(74)	73	476.7979	2
	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 5-like		XP_015742493.1	^a	73	1	(214)SLNNKFASFIDK(225)	73	692.3505	2
	PREDICTED: phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	XP_015722493.1	^a	161	10	(215)VLIAAHGNSLR(225)	77	575.8371	2
							(257)NLKPVKPMQFLGDAETVR(274)	84	687.0345	4
	PREDICTED: proteasome subunit beta type-3	PSMB3	XP_015741214.1	^a	91	8	(49)LYIGLAGLATDVQTVQR(66)	91	945.0304	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit beta	CCT5	XP_015711605.1	^a	187	5	(389)SLHDALCVLAQTVK(402)	104	777.9193	2
							(502)QVLLSAAEAAEMILR(516)	84	815.9497	2
	PREDICTED: T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	XP_015739782.1	^a	99	2	(439)AVAQALEVIPR(449)	99	583.8474	2
	PREDICTED: tubulin alpha-3 chain	N/A	XP_015727678.1	^a	76	3	(230)LIGQIVSSITASLR(243)	76	729.4392	2
24	elongation factor 1-alpha, partial	EF1A	AJP09268.1	^a	73	4	(110)IGGIGTVPVGR(120)	73	513.3056	2
	PREDICTED: leucine zipper transcription factor-like protein 1	N/A	XP_015709640.1	^a	82	3	(98)LQTDISELENR(108)	82	659.3367	2
	PREDICTED: phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	XP_015722493.1	^a	226	16	(100)TLWNVLDAIDQMWLPPVVR(117)	72	1093.088	2
							(215)VLIAAHGNSLR(225)	72	5	3
							(257)NLKPVKPMQFLGDAETVR(274)	82	384.2213	3
	PREDICTED: proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein	PROSC	XP_015738610.1	^a	73	4	(192)GPNPDFQVLLSLR(204)	73	728.4049	2
	PREDICTED: tubulin alpha-3 chain	N/A	XP_015727678.1	^a	74	3	(230)LIGQIVSSITASLR(243)	74	729.4400	2
25	PREDICTED: 60S ribosomal protein L10a		XP_015740653.1	^a	73	5	(106)KYDAFLASESLIK(118)	73	742.9061	2
	PREDICTED: 6-phosphogluconolactonase	PGLS	XP_015705947.1	^a	77	6	(33)FTLGLSGGSLVGLLAR(48)	77	780.9636	2
	Apolipoprotein A-I	APOA1	APOA1_COTJA	^b	73	3	(219)VVEQLSNLR(227)	73	529.3008	2
	PREDICTED: C-factor-like		XP_015729251.1	^a	91	5	(152)AAIINISTVLGSIER(166)	91	778.9551	2
	elongation factor 1-alpha, partial	EF1A	AJP09268.1	^a	77	4	(110)IGGIGTVPVGR(120)	77	513.3095	2
	PREDICTED: peroxiredoxin-6	PRDX6	XP_015724871.1	^a	163	12	(24)FHDFLGDSWGILFSHPR(40)	75	677.6623	3
							(162)VVDSLQLTAYK(172)	88	618.8439	2
	PREDICTED: protein SGT1 homolog		XP_015707211.1	^a	82	4	(64)SLELNPSNAIALLR(77)	82	755.9357	2
	PREDICTED: protein syndesmos	NUDT16L1	XP_015732887.1	^a	76	5	(182)MGGLPNFLANSFVGPAK(198)	76	868.4495	2
	PREDICTED: pseudouridine-5'-phosphatase isoform X1		XP_015704461.1	^a	73	3	(61)ALEGAQIVR(69)	75	478.7775	2
	PREDICTED: triosephosphate isomerase	TPI1	XP_015728262.1	^a	147	10	(160)VVLAYEPVWAIQTGK(174)	74	801.9460	2
							(194)SHVSDAVAQSTR(205)	73	629.3153	2

	PREDICTED: tubulin alpha-8 chain	N/A	XP_015740341.1	a	74	3	(215)LIGQIVSSITASLR(228)	74	729.4400	2
	PREDICTED: UPF0568 protein C14orf166 homolog		XP_015721446.1	a	97	5	(132)AGVMALANLLQIQR(145)	97	757.4320	2
26	PREDICTED: triosephosphate isomerase	TPI1	XP_015728262.1	a	172	11	(160)VVLAYEPVWAI GTGK(174) (206)IYGGSV TGGNCK(218)	78 94	801.9532 663.3273	2 2
	PREDICTED: tubulin beta chain	TUBB4B	XP_015706308.1	a	98	2	(170)FPGQLNADLR(179)	98	565.8027	2
27	PREDICTED: aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2		XP_015737793.1	a	74	4	(189)FYAYNPLAGLLTGK(203)	74	792.9374	2
	Apolipoprotein A-I	APOA1	APOA1_COTJA	b	97	5	(69)LADNLD TLSAAAAK(82)	97	687.3734	2
	PREDICTED: creatine kinase B-type isoform X2	CKB	XP_015720975.1	a	76	3	(152)LSVEALGSLSGDLK(165)	76	694.8885	2
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	b	72	7	(161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAI TATQK(184)	72	653.5927	5
28	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	b	155	11	(65)LVINGNAITIFQER(78) (161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAI TATQK(184)	72 82	794.4517 871.1240	2 3
	PREDICTED: tubulin alpha-3 chain	N/A	XP_015727678.1	a	78	3	(230)LIGQIVSSITASLR(243)	78	729.4408	2
	PREDICTED: tubulin beta chain	TUBB4B	XP_015706308.1	a	74	3	(91)IMNTFSV VPSPK(102)	74	668.3594	2
29	PREDICTED: adenylate kinase isoenzyme 1 isoform X2	AK1	XP_015734868.1	a	74	7	(110)IGPPTLLLYVDAGK(123)	74	728.9299	2
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	b	185	11	(65)LVINGNAITIFQER(78) (65)LVINGNAITIFQER(78) (161)VIHDNFGIVEGLMTTVHAI TATQK(184)	93 100 84	794.4517 794.4542 871.1240	2 2 3
	PREDICTED: tubulin beta-1 chain isoform X2	N/A	XP_015737231.1	a	71	3	(91)IMNTFSV VPSPK(102)	71	668.3535	2
30	heat shock protein 90 alpha, partial	N/A	AAL83217.1	a	73	5	(87)TLTIVDTGIGMTK(99)	73	683.3676	2
31	PREDICTED: tumor protein D54 isoform X1	AAES_188100	XP_015737294.1	a	94	5	(163)TSAALS NVGSVISR(176)	94	681.3772	2
32	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: proteasome subunit beta type-5	PSMB5	XP_015706419.1	a	91	5	(73)ATAGSYIASQTVQK(86)	91	712.8786	2
33	PREDICTED: heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	XP_005238716.1	a	76	1	(83)TLTLVDTGIGMTK(95)	78	683.3657	2
	PREDICTED: tubulin beta chain	TUBB4B	XP_015706308.1	a	85	4	(291)MSATFIGNSTAIQELFK(307)	85	937.4821	2
34	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase 1	AAES_32060	KQL52048.1	a	76	5	(84)TGEVAVLQR(92)	76	486.7772	2
	PREDICTED: prefoldin subunit 5	VBP1	XP_015705869.1	a	74	10	(139)IQQLTAMGAAQGATTK(154)	74	803.4242	2
	PREDICTED: superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	XP_015736733.1	a	75	12	(12)GDGPVEGVIHFQQQSGSPV K(31)	75	679.3410	4
35	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G3P_COTJA	b	92	4	(233)VPTPNVSVVDLTCR(246)	92	778.9147	2

PREDICTED: profilin-1-like		XP_015130231.1	^a	75	7	(27)DTPAVWAATPGK(38)	75	607.3161	2
PREDICTED: protein disulfide-isomerase A6	AAES_1298	XP_015714908.1	^a	76	3		76	708.8924	2

24