



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DO PLASMA SEMINAL EQUINO

VERÔNICA LA CRUZ BUENO

PORTO ALEGRE

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DO PLASMA SEMINAL EQUINO

AUTOR: VERÔNICA LA CRUZ BUENO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

**ORIENTADORA: SANDRA MARA DA ENCARNAÇÃO FIALA
RECHSTEINER**

COORIENTADOR: HENRIQUE BOLL DE ARAUJO BASTOS

PORTO ALEGRE

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

CIP - Catalogação na Publicação

La Cruz Bueno, Verônica
PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DO PLASMA SEMINAL EQUINO
/ Verônica La Cruz Bueno. -- 2013.
116 f.
Orientadora: Sandra Mara DA ENCARNAÇÃO FIALA
RECHSTEINER.

Coorientador: Henrique BOLL DE ARAUJO BASTOS.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Indivíduo. 2. Infertilidade. 3. Proteínas. 4. Metabólitos. 5. Equinos. I. DA ENCARNAÇÃO FIALA RECHSTEINER, Sandra Mara, orient. II. BOLL DE ARAUJO BASTOS, Henrique, coorient. III. Título.

VERÔNICA LA CRUZ BUENO

PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DO PLASMA SEMINAL EQUINO.

APROVADO POR:

Profa. Dra. Sandra Mara Da Encarnação Fiala Rechsteiner.
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Ivan Bustamante Filho
Membro da Comissão

Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Membro da Comissão

Prof. Dra. Monique Lagares de Albuquerque
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde, por me orientar nas escolhas certas, por me dar forças nos momentos mais difíceis e por fazer possível a realização de cada conquista.

À minha família, em especial a minha filha Laura Bueno da Silva. Você é a cor, a luz e a alegria de todos os meus dias.

À minha orientadora Professora Dra. Sandra Fiala Rechsteiner por todo apoio e orientação durante esses anos de mestrado e doutorado, sempre me incentivando em busca do conhecimento científico e contribuindo para minha formação como pesquisadora e como pessoa. Ainda, pela amizade e confiança dispensadas, sobretudo, pela seriedade e profissionalismo que tanto contribuíram para minha formação.

Ao meu coorientador Dr. Henrique Boll de Araujo Bastos, por me incluir nessa bela linha de pesquisa, pelos vários ensinamentos e parceria em diversos estudos. Por todas as oportunidades que me foram dadas e pela confiança em mim e no meu trabalho. Pela amizade que construímos e pelo exemplo de que é para mim. Minha eterna gratidão.

Ao Professor Dr. Rodrigo Costa Mattos, sempre solícito e disposto a ajudar e esclarecer diversas dúvidas em todos os momentos. Sua colaboração foi fundamental para a realização deste projeto.

Ao Dr. Edvaldo Barros e toda equipe NuBiMol da UFV, pela receptividade, ajuda com a espectrometria de massa e desenvolvimento do artigo.

Ao Dr. Aleksandro Dallegre e toda equipe do Centro de Biotecnologia (CBiot) da UFRGS, que foram essenciais para a realização deste trabalho, pela ajuda com a cromatografia líquida.

À Dra. Caroline Zanotto e toda a equipe da Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS laboratório 33, pela ajuda na quantificação das proteínas.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos por compartilharem o conhecimento e possibilitar meu crescimento profissional.

A todos os colegas que passaram pelo nosso laboratório nesses anos e colaboraram em alguma etapa do desenvolvimento do trabalho, em especial ao Gustavo Larentis, pela amizade e convívio.

À Banca muito obrigada por aceitarem o convite.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudo.

“O homem tem o tamanho daquilo que se atreve a fazer”.
Jorge Angel Livraga

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Relação linear multinível entre domínios 'omics', com o correspondente comum disponível técnicas para estudar os respectivos domínios (SIMINTIRAS; FORDE, 2017).....26
- Figura 2 Exemplo de diagrama gráfico de uma configuração de LC-MS (NorthEast et al., 2022).....33
- Figura 3 Exemplo de gráfico de resultado da análise LC-MS (NORTHEAST et al., 2022). Este gráfico mostra as intensidades de pico dos íons do analito versus seu tempo de retenção. Além disso, cada ponto no cromatograma está relacionado com um espectro de massa.....34
- Figura 4 Representative SDS-PAGE 2D with spots from the seminal plasma in stallion HP group. Numbers in the figure correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.....67
- Figura 5 Representative SDS-PAGE 2D with spots from the seminal plasma in stallion LP group. Numbers in the figure correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.....67
- Figura 6 Mean (\pm SEM) relative abundance (%) of proteins with higher abundance in the seminal plasma in stallion HP group with significant differences ($P < 0.05$) between groups. The letter A and B mean difference in magnitude on the scale. Numbers in the graphic correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.....68
- Figura 7 Mean (\pm SEM) relative abundance (%) of proteins with higher abundance in the seminal plasma in stallion LP group with significant differences ($P < 0.05$) between groups. A pound mark (*) indicates indicates that the mean has a tendency to differ significantly. The letter A and B mean difference in magnitude on the

scale. Numbers in the graphic correspond to the Spot ID shown in
Tables 1 and 2.....69

Figura 8 Mean (\pm SEM) relative area (%) of metabolites with different
abundances in the HP and LP group significant differences ($P < 0.05$)
between groups. A pound mark (*) indicates that the mean has a tendency
to differ significantly.....69

LISTA TABELAS

Table 1 Proteins identified in plasma seminal, using MALDI TOF/TOF, MASCOT algorithm and SCAFFOLD software.....	58
Table 2 BLAST of proteins from plasma seminal identified by MASCOT as “Uncharacterized protein”	60
Table 3 Pearson’s correlation coefficient between seminal parameters, pregnancy rate and the relative area of spots protein. Numbers in the table correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.....	61
Table 4 Pearson’s correlation coefficient between seminal parameters, pregnancy rate and the relative area of metabolites.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A Raça Crioula	17
2.3 Fertilidade	18
2.4 Espermatozoide	19
2.5 Plasma Seminal	20
2.5.1 Produção Plasma Seminal.....	22
2.6 Fecundação	23
2.7 Biologia Molecular	25
2.7.1 Transcriptoma	26
2.7.2 Proteômica.....	27
2.7.3 Metabolômica.....	30
3 ARTIGO	36
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

APÊNDICE A - Imagem representativa da Isoeletrofocalização baseada na migração de uma partícula carregada sob influência de um campo elétrico pelo software Ettan IPGphor3.....94

APÊNDICE B - Imagem representativa da análise do gel de eletroforese bidimensional pelo software ImageMaster™ 2D Platinum.....95

APÊNDICE C - Imagem representativa da identificação dos metabólitos alvos análise pelo Compass DataAnalysis.....96

APÊNDICE D - Imagem representativa da quantificação de área do metabólito pelo Compass DataAnalysis.....97

APÊNDICE E - Interação entre as proteínas identificadas e validadas estatisticamente, adotando escore 0,900 obtidas pelo aplicativo STRING 11.5.....98

APÊNDICE F - Interação entre as proteínas identificadas e validadas estatisticamente, adotando escore 0,400 obtidas pelo aplicativo STRING 11.5.....99

APÊNDICE G - Interações primárias e secundárias entre as proteínas identificadas e outras proteínas anotadas no aplicativo STRING 11.5.....100

APÊNDICE H - Representação esquemática da via do metabolismo do colesterol. Fonte: Kegg.....	101
APÊNDICE I - Correlação de Person	102
ANEXO 1: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL.....	112
ANEXO 2: IX INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION.....	114

PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DO PLASMA SEMINAL EQUINO

RESUMO

Diferente de outras espécies domésticas de interesse zootécnico, os equinos são valorizados como indivíduo, animais de alto padrão genético atingem valores elevados de comércio e reprodução. Os reprodutores equinos, assim como os humanos, geralmente recebem tratamento médico para a infertilidade. Os métodos de avaliação convencional de sêmen na maioria das vezes fornecem apenas informações descritivas e têm limitações para prever fertilidade. No entanto, várias abordagens moleculares, como a proteômica e metabolômica, proporcionaram uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos causadores da infertilidade masculina. O objetivo deste projeto foi avaliar a proteômica e metabolômica do plasma seminal equino. Foram utilizados 24 garanhões. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer. As demais análises microscópicas foram realizadas através do Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision. A análise da integridade física da membrana foi realizada utilizando-se sondas fluorescentes. A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Um ejaculado de cada garanhão foi coletado durante a estação reprodutiva e a fertilidade dos garanhões selecionados foi avaliada através do histórico reprodutivo. As taxas de prenhez variaram de 20,2% a 95,6% e os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Alta taxa de prenhez (HP), com taxa de prenhez por ciclo acima de 51%, e Grupo Baixa prenhez (LP), com taxa de prenhez por ciclo igual ou abaixo de 50%. Após a análise espermática, o plasma seminal foi separado e preparado para a identificação de proteínas e metabólitos do plasma seminal. As proteínas foram identificadas através da técnica de eletroforese bidimensional; já para identificação dos metabólitos a técnica utilizada foi a cromatografia líquida. Foi realizada a média e desvio padrão de todas as variáveis analisadas e correlação entre as taxas de prenhez e parâmetros seminais, integridade da membrana plasmática, funcionalidade da membrana plasmática, defeitos maiores, defeitos menores, proteínas e metabólitos do plasma seminal. O Teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar distribuição dos dados. Para dados paramétricos, o teste utilizado foi a Anova e para dados não paramétricos o teste utilizado foi o

kruskal Wallis. Para análise estatística, foi utilizada a correlação de Pearson. De um total de 713 spots detectados, 24 spots foram selecionados e 26 proteínas foram identificadas. Em relação aos metabólitos, 18 foram identificados. A identificação de marcadores positivos e negativos referentes à fertilidade é uma ferramenta para auxiliar a detecção de alterações que comprometam a vida reprodutiva do garanhão. A compreensão aprofundada dos componentes proteicos e metabólicos do plasma seminal é importante para desvendar a fisiologia da reprodução, auxiliando na compreensão da infertilidade na espécie equina, podendo levar ao desenvolvimento de um produto que aumente as características seminais relacionadas à fertilidade masculina.

Palavras-chave: Indivíduo, infertilidade, proteínas e metabólitos.

PROTEOMIC AND METABOLOMIC OF EQUINE SEMINAL PLASMA. RESUMO INGLÊS

PROTEOMIC AND METABOLOMIC OF EQUINE SEMINAL PLASMA.

Diffetrent other domestic species of zootechnical interest, horses are valued as individuals, animals of high genetic standard reach high values of trade and reproduction. Equine breeding stock, like humans, often receives medical treatment for infertility. Conventional semen assessment methods most often only provide descriptive information and have limitations in predicting fertility. However, several molecular approaches, such as proteomics and metabolomics, have provided a deeper understanding of the mechanisms causing male infertility. The objective of this project was to evaluate the proteomics and metabolomics of equine seminal plasma. Twenty four stallions were used. Sperm concentration was evaluated in a Neubauer chamber. The other microscopic analyzes were performed using the Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision. The analysis of the physical integrity of the membrane was performed using fluorescent probes. The functional integrity of the plasma membrane was assessed using the hyposmotic test. One ejaculate from each stallion was collected during the breeding season and the fertility of selected stallions was assessed through their reproductive history. Pregnancy rates ranged from 20.2% to 95.6% and the animals were divided into two groups: High Pregnancy Rate (HP) Group, with pregnancy rate per cycle above 51% and Low Pregnancy Group (LP), with pregnancy rate per PT cycle equal to or below 50%. After sperm analysis, seminal plasma was separated and prepared for the identification of seminal plasma proteins and metabolites. The proteins were identified through the technique of two-dimensional electrophoresis, for the identification of the metabolites, the technique used was liquid chromatography. The mean and standard deviation of all variables analyzed and correlation between pregnancy rates and seminal parameters, plasma membrane integrity, plasma membrane functionality, major defects, minor defects, proteins and seminal plasma metabolites were performed. Shapiro-Wilk test was performed to assess data distribution. For parametric data the test used was the Anova and for non-parametric data the test used

was the Kruskal Wallis. For statistical analysis, Pearson's correlation was used. From a total of 713 detected spots, 24 spots were selected and 26 proteins were identified. Regarding the 18 metabolites were identified. The identification of positive and negative markers related to fertility is a tool to help detect changes that compromise the reproductive life of the stallion. The in-depth understanding of the protein and metabolic components of seminal plasma is important to unravel the physiology of reproduction, aiding in the understanding of infertility in the equine species, which may lead to the development of a product that increases the seminal characteristics related to male fertility.

Keywords: Individual, infertility, proteins and metabolites.

1. INTRODUÇÃO

O efetivo mundial de equinos é estimado em 60.566.601 de cabeças, das quais cerca de 54% encontra-se nas Américas (FAO, 2021). O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o quarto mundial. A tropa nacional é superior a cinco milhões de cavalos, computados os cavalos de lida, os de raça, lazer e competição. A atividade movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera mais de 610 mil empregos diretos e 2.430 milhões empregos indiretos, sendo responsável, por três milhões de postos de trabalho (MAPA, 2017). Nos últimos anos a equideocultura deu um salto qualitativo, havendo hoje no mercado animais de alto valor. Isso é possível devido aos avanços na área da genética animal.

O estudo da reprodução equina é fomentado cada vez mais como ferramenta para acelerar o ganho genético e competitividade na indústria do cavalo (HINRICHS, 2013). Diferente de outras espécies domésticas de interesse zootécnico, os equinos são valorizados como indivíduo (CHOWDHARY et al., 2008, VARNER et al., 2008). O aspecto reprodutivo na maioria das vezes não é levado em consideração (HARALD; OTTMAR, 2012). A seleção de garanhões é baseada na genética, performance e conformação. Claramente, a saúde reprodutiva do animal não é inserida nesta seleção. Os garanhões representam 50% da equação da reprodução e a indústria do cavalo é repleta de garanhões com nível de fertilidade indesejável (VARNER et al., 2008).

Dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal assume um efeito considerável. Os testes laboratoriais de rotina, aplicados na avaliação da qualidade do sêmen, por muitas vezes não são capazes de determinar o potencial de fertilidade dos reprodutores (JOBIM et al., 2009; MOURA et al., 2011). Diversos estudos sugerem que componentes moleculares dos espermatozoides, ou do meio que os cercam, podem influenciar sua capacidade fecundante (BELARDIN et al., 2019). A redução da fertilidade no garanhão resulta em importantes perdas econômicas para a indústria equina (MOURA et al., 2011). A fertilidade do macho é complexa, e depende de uma população heterogênea de espermatozoides que irá interagir de diferentes formas em diversos locais do trato reprodutor da fêmea, zona pelúcida e oócito (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2013).

Neste contexto a biotecnologia da reprodução se coloca como uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético uma vez que é utilizada para aumentar a produção de potros e contribui com pesquisadores e profissionais que trabalham com reprodução equina (HINRICHS, 2013).

A identificação de marcadores associados com características economicamente importantes, como a reprodução, permite que os pesquisadores desenvolvam testes específicos de diagnóstico e elaborem medidas preventivas de manejo e tratamento, possibilitando o desenvolvimento de novos critérios para a predição e aumento da fertilidade masculina (BROSNAHAN et al., 2010). As abordagens “ômicas”, como genômica, transcriptômica e proteômica, têm sido usadas para determinar os componentes moleculares da fertilidade. Como resultado, estudos mostram que os compostos moleculares encontrados no sêmen e no plasma seminal estão significativamente associados à fertilidade (VELHO et al., 2018).

A proteômica seminal tornou-se essencial para identificação de propriedades e funções de proteínas envolvidas nos mecanismos de regulação das funções no trato reprodutor masculino e conseqüentemente, no processo de fecundação (MILARDI et al., 2013). Pesquisas sobre a identificação de proteínas expressas nos fluidos reprodutivos são realizadas com o intuito de identificar biomarcadores de fertilidade (MOURA et al., 2011). Os reprodutores equinos, assim como os homens, geralmente recebem tratamento médico para a infertilidade (ING et al., 2014). Marcadores biológicos ou biomarcadores são entidades que podem ser medidas experimentalmente e indicam a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica de um organismo e adicionalmente, funcionam como um indicador de uma via fisiológica (GARBAN et al., 2006)

Os metabólitos presentes no plasma seminal desempenham diversos papéis relacionados à função espermática, como produção de energia, motilidade, proteção, controle do pH e regulação da atividade metabólica (VELHO et al., 2018). A metabolômica é uma técnica emergente e tem se mostrado promissora na identificação de potenciais biomarcadores de fertilidade masculina e infertilidade. Tem despertado interesse significativo para estudar e compreender os processos biológicos fundamentais relacionados à reprodução

(MUÑOZ et al., 2014), uma vez que permite a identificação e quantificação de pequenas moléculas, como aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, carboidratos em secreções, células, tecidos e órgãos (DUNN et al., 2005).

Mesmo existindo variações nos processos reprodutivos das diversas espécies, é possível reconhecer padrões gerais no plano estrutural e funcional e buscar modelos experimentais mais adequados à espécie humana. Tendo em vista os avanços obtidos em outras espécies, tais como: camundongos, humanos, suínos, felinos, bovinos e ovinos (SAUNDERS et al., 2002; KUROKAWA et al., 2005; VILLAVERDE, 2010; MOURA et al., 2006; SILVA, et al., 2012), com pesquisas sobre marcadores de fertilidade e a importância deste tema na esfera reprodutiva. Torna-se imprescindível o desenvolvimento de estratégias para a identificação, caracterização e compreensão de componentes de interesse e sua participação nas células espermáticas, relacionando-os aos processos de fecundação e melhorias de indicadores reprodutivos. O objetivo desse trabalho foi investigar a proteômica e metabolômica do plasma seminal equino e sua relação com a fertilidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Raça Crioula

A raça Crioula é o resultado de uma seleção natural que ocorreu principalmente na América do Sul, por cerca de quatro séculos. Os cavalos Crioulos são considerados extremamente bem adaptados à região, devido ao fato de que somente os mais fortes sobreviviam e conseguiam passar seus genes para as futuras gerações (ABCCC, 2023). Representando um papel de grande importância na cultura do Rio Grande do Sul, os cavalos da raça Crioula são originados na região do Pampa (GIANLUPPI et al., 2009). São animais descendentes das raças Andaluz e Bérbere, trazidos por conquistadores do século XV. O cavalo que aportou na América era a mais desenvolvida ferramenta de guerra existente na época. A partir do século XVII, muitos cavalos foram perdidos ou abandonados, reproduzindo-se de forma livre pelo sul do continente. Na região das cordilheiras e pampas, formaram-se manadas

extremamente bem adaptadas à região devido à seleção natural ao longo dos quatro séculos (TEIXEIRA, 2011).

No final do século XIX e início do século XX, criadores argentinos, uruguaios e brasileiros começaram a se conscientizar da importância e da qualidade dos cavalos que habitavam suas propriedades e deram início à recuperação destes animais, contribuindo assim, para a formação da raça Crioula. Esta nova raça passou a ser preservada quando várias associações foram criadas, comprovando o valor do cavalo Crioulo. Hoje são mais de 400 mil animais distribuídos em 100% do território nacional (ABCCC, 2023).

2.3 Fertilidade

O termo fertilidade é habitualmente utilizado na indústria equestre para relatar a percentagem de fêmeas clinicamente prenhes em um momento definido, após a monta natural ou inseminação artificial. Este valor sempre será menor do que a percentagem de ovócitos fecundados in vivo pelo sêmen de um determinado garanhão (AMANN, 2005). Assim a fertilidade, na verdade, é o produto da fertilidade masculina X fertilidade feminina X todas as outras fontes de variação, o que dificulta a atribuição do resultado obtido observado quanto ao reprodutor ou ao sêmen (AMANN; HAMMERSTEDT, 2002).

A fertilidade masculina refere-se à capacidade de um animal produzir espermatozoides com a capacidade de fecundar o oócito, resultando em uma prole viva. É afetada por vários fatores, incluindo manejo, nutrição, doença, estresse, idade e genética (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2013; VELHO, et al., 2018). Diferente de outras espécies de interesse econômico, como bovinos, por exemplo, os garanhões são selecionados pelas características como conformação, resultados em competição ou devido a sua genealogia. A indústria equestre está repleta de reprodutores que possuem índices de fertilidade insatisfatórios ou abaixo do preconizado para outras espécies (VARNER et. al., 2008).

As modernas técnicas de reprodução possibilitam melhorar a fertilidade. No entanto, não podemos esquecer nem da fonte genética nem da herança epigenética de algumas situações de infertilidade sob pena de se comprometer a capacidade de gerar descendência nas gerações subsequentes (GAMBOA,

2011). O conhecimento de genes do espermatozoide de humanos já está bem documentado (LAMBARD et al., 2004), enquanto poucos estudos estão disponíveis para equinos. A descoberta de genes específicos relacionados à fertilidade é uma necessidade para a indústria do cavalo.

2.4 Espermatozoide

O espermatozoide é uma célula constituída por cabeça e cauda (colo, peça intermédia, principal e terminal). O pescoço consiste na junção altamente especializada entre o bordo posterior da cabeça e a peça intermédia da cauda. Em equino, as cabeças têm um formato achatado, em forma de raquete, com dimensões aproximadas de 60-65 μm de comprimento total, 6-7 μm comprimento de cabeça, 10 μm parte média, 40 μm parte principal e 4-5 μm parte final (MEYERS, 2009). Quanto à largura, a cabeça possui aproximadamente 3,5-4 μm no segmento equatorial do acrossoma, a parte mais larga da célula, que contem também o núcleo (AMANN; GRAHAM, 1993).

A cabeça do espermatozoide é formada pelo acrossoma, lâmina pós-acrossomal e núcleo. No núcleo, os dois terços anteriores são sobrepostos pelo acrossoma, que formam uma vesícula especializada originada do complexo de Golgi, uma membrana de duas camadas que contém enzimas hidrolíticas essenciais para a penetração do espermatozoide no oócito (CUNHA, 2015). O núcleo preenche a maior parte da cabeça do espermatozoide e é onde fica armazenado o material genético em formato de DNA altamente condensado e contido por dupla camada nuclear (BRITO, 2007).

Podemos subdividir o espermatozoide em membrana plasmática, acrossoma, núcleo e flagelo, onde se inclui uma camada mitocondrial. A membrana plasmática cobre totalmente toda a célula e consiste numa bicamada fosfolipídica com incorporação de moléculas de colesterol (estabilizador de membrana), carboidratos complexos e proteínas associadas à lípidos ou ao glicocálice (MEYERS, 2009).

Certas proteínas transmembranares auxiliam na formação de canais iônicos, poros, receptores ou componentes de transdução de sinal, constituindo no seu total cerca de 50% do peso molecular da membrana. A membrana

plasmática encontra-se ancorada às estruturas subjacentes na região do acrossoma espermático, lâmina pós acrossômica e região do colo. Na cabeça do espermatozoide a membrana encontra-se dividida em duas regiões, a acrossômica, incluindo o anel celular periférico e a maior parte do acrossoma, e pós acrossômica ou segmento equatorial, onde se inicia a fusão entre o espermatozoide e a zona pelúcida. Ambas as zonas constituem a cápsula acrossômica. A composição da membrana em termos de lípidos, proteínas e carboidratos é variável entre a cabeça e cauda do espermatozoide (MEYERS, 2009). Desta maneira, a integridade da membrana torna-se essencial para o metabolismo normal do espermatozoide, capacitação e reação acrossômica. A reação acrossomal, resultante da liberação e ativação das enzimas acrossomais, é ativada pela ligação do espermatozoide com a zona pelúcida. A fecundação só ocorrerá caso o acrossomo permaneça intacto durante todo trajeto espermático pelo trato reprodutor feminino até o momento final da ligação com a zona pelúcida (SILVA; GADELLA, 2006).

Após a espermatogênese, os espermatozoides ainda não são capazes de fecundar o oócito. Os últimos estágios de diferenciação de espermátides são marcados pela condensação do DNA, que diminui progressivamente o processo de transcrição e tradução no gameta até sua estagnação. Nos mamíferos a capacidade de fecundação é adquirida durante o trânsito epididimário, onde sucessivas modificações morfofuncionais contribuem para a maturação do espermatozoide (DACHEUX et al., 2003).

2.5 Plasma Seminal

O sêmen é composto por duas frações distintas, os espermatozoides, que compõem menos que 1% do volume total e o plasma seminal (GUASTI et al., 2020). O plasma seminal é um fluido com papel essencial para as funções espermáticas in vivo, desde a ejaculação até a fecundação (KRAUS et al., 2005). Durante o transporte, através do epidídimo, e na ejaculação, os espermatozoides adquirem várias proteínas oriundas do fluido epididimário e das secreções das glândulas acessórias, além de terem contato também com hormônios produzidos, principalmente, nos testículos (YANAGIMACHI, 1994). Também apresenta sais minerais e hormônios que atuam juntamente a estas

proteínas, tendo importantes funções fisiológicas sobre as células espermáticas (JELÍNKOVÁ et al., 2003).

Em equinos, este fluido é expelido em frações durante a ejaculação e sua composição apresenta diferentes aspectos bioquímicos de acordo com a fração expelida. A primeira porção ejaculada é a fração pré-espermática, aquosa, e provém das glândulas bulbouretrais e da próstata. Esta fração possui a função de limpeza da uretra. A segunda fração é rica em espermatozoides, leitosa e é composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente. A terceira porção contém poucos espermatozoides, porém grandes quantidades de ácido cítrico e gel proveniente das vesículas seminais, com a função de carrear os poucos espermatozoides que restaram na uretra (KAREKOSKI; KATILA, 2008; GUSTI et al., 2020).

Variações na composição do PS de diferentes machos têm sido relacionadas a diferentes índices de fertilidade (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1998; BELLIN et al., 1996; BRANDON et al., 1999; KOISTINEN et al., 2000; MOURA et al., 2006). O PS é um fluido complexo onde encontramos grandes quantidades de água, íons inorgânicos, ácido cítrico, açúcares, sais orgânicos, prostaglandinas e um número variado de proteínas que servirão de tampão, mantendo uma osmolaridade e pH adequados, além de proporcionar fontes de energia para o metabolismo espermático, tanto aeróbico como anaeróbico (MANN; LUTWAK-MANN, 1981).

O PS possui em sua composição substâncias moduladoras da inflamação uterina que auxiliam na eliminação dos espermatozoides e na limpeza uterina de éguas com endometrite (TROEDSSON et al., 2005). O PS contém uma série de agentes antioxidantes enzimáticos, como a catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase; e não enzimáticos como a albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina. A atividade destas enzimas no plasma seminal inibe a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) protegendo os espermatozoides do dano celular causado pelo estresse oxidativo (GUSTI ET AL., 2020).

Também contém proteínas que podem influenciar a criopreservação e prevenir a capacitação devido a alterações no congelamento e descongelamento (AL-ESSAWE et al., 2018). Variações na composição do PS de diferentes machos têm sido relacionadas a diferentes índices de fertilidade (MOURA et al.,

2006). Após a ejaculação, os espermatozoides procedentes do epidídimo entram em contato com as distintas secreções procedentes das glândulas vesiculares, próstata e bulbouretrais. O conjunto de substâncias produzidas por estas glândulas é espécie específico e altamente variável entre indivíduos da mesma espécie, assim como entre ejaculados de um mesmo indivíduo, podendo ainda variar com a estação do ano, estado fisiológico do animal (CARDOZO et al., 2006) e está envolvido em diversas funções espermáticas e eventos que precedem a fecundação (KARESKOSKI; KATILA, 2008). O contato dos espermatozoides com as distintas substâncias que compõe o PS ocorre de forma sequencial. Os espermatozoides passam através do epidídimo, onde vão adquirir sua capacidade fecundante e motilidade (FRANÇA et al., 2005).

Apesar do PS demonstrar funções específicas nos eventos da fecundação, as técnicas de criopreservação de sêmen de equinos preconizam a retirada deste fluido (RAMIRES NETO et al., 2013), substituindo-o por diluentes, uma vez que estudos demonstram que o acréscimo de plasma seminal promove um efeito deletério sobre a preservação das células espermáticas (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

Os elementos do plasma seminal podem interferir tanto positiva quanto negativamente na fertilidade, sendo possível que a expressão de algum desses produtos, neste meio, possam servir como marcadores para a fertilidade por evidenciar, primariamente, a qualidade do fluido seminal (BELLIN et al., 1998).

2.5.1 Produção Plasma Seminal

O PS é o fluido no qual os espermatozoides estão suspensos na ejaculação, fornecendo o meio de sobrevivência e favorecendo o transporte espermático, consiste em um fluido produzido pela rete testis, epidídimo e glândulas sexuais acessórias (MANN; LUTWAK-MANN, 1981).

O epidídimo é anatomicamente conectado ao testículo e pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. Cada região secreta substâncias específicas que promovem mudanças na composição química e proteica do fluido epididimário, essenciais para a diferenciação e manutenção da célula espermática (DACHEUX et al., 2003; GATTI et al., 2004, GUSTI ET AL., 2020). Este controle extragonadal da diferenciação espermática é chamado de maturação

espermática epididimária, na qual o gameta masculino adquire a habilidade de reconhecer e ligar-se a zona pelúcida e capacidade de fusão com oócito (DACHEUX; DACHEUX, 2014). A maioria das proteínas luminais são secretadas ativamente pelo epitélio epididimário e está relacionada com a proteção do espermatozoide durante sua passagem pelo epidídimo, como a redução de espécies reativas ao oxigênio (ROS), ação antibacteriana e proteção dos sítios ativos na superfície de membrana (GUAISTI et al., 2020).

As glândulas anexas no garanhão são constituídas por: próstata, glândulas bulbouretral e vesícula seminal. A glândula prostática compreende duas porções: uma estrutura bilobulada, circundando a uretra, e outra chamada de istmo, entre os lóbulos. As secreções da próstata são conduzidas até o lúmen da uretra por meio de vários ductos (15 a 20), que vão ajudar a formar o líquido seminal. A glândula bulbouretral está localizada na superfície dorsal da uretra pélvica, cerca de 8 cm caudalmente à próstata. As secreções da glândula bulbouretral fazem parte da primeira fração do ejaculado e têm a função de limpar a uretra antes da ejaculação. As vesículas seminais são glândulas pareadas e priformes, medindo de 15 a 20 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro. São responsáveis pela produção da fração gelatinosa do ejaculado que é secretada normalmente no final da ejaculação (PAPA; PAPA 2020). A aparência típica normal da rete testis consiste numa estrutura hipoecóica serpiginosa que comunica o mediastino testicular à cabeça do epidídimo, usualmente localizada na região póstero-lateral do testículo (VITAL et al, 2007).

2.6 Fecundação

A fecundação ocorre quando há fusão do oócito com o espermatozoide. É necessário que ocorra a migração espermática entre as células do cumulus oophorus, a união da cabeça do espermatozoide à zona pelúcida e em seguida a penetração do espermatozoide por uma abertura através da zona pelúcida para atingir a membrana vitelínica e, por último, a fusão dos gametas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). No momento da ovulação ocorre a liberação do oócito maturado, o qual foi submetido a transformações durante o desenvolvimento folicular, como a formação da zona pelúcida e a retomada e finalização da primeira divisão meiótica, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, em preparo para a

fecundação. A placa metafásica marca o início da segunda divisão meiótica, porém a meiose não pode continuar até que ocorra a penetração do espermatozoide no oócito (GINTHER, 1992).

Para atingir a capacidade de fecundação os espermatozoides passam por várias modificações sequenciais incluindo a maturação, capacitação e a reação do acrossoma. Os componentes de sua superfície são modificados ou removidos pelas secreções do trato genital feminino, desestabilizando a bicamada fosfolipídica e permitindo a ativação do acrossoma. A capacitação desencadeia a reação acrossomal que envolve a fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrossoma, seguida por uma extensa vesiculação sobre o segmento anterior do acrossoma. Essa reação promove a liberação de enzimas hidrolíticas, como hialuronidase e acrosina que são necessárias para a penetração no oócito (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A união da cabeça do espermatozoide à zona pelúcida é regida por receptores espermáticos específicos na sua superfície. A zona pelúcida é sintetizada pelo oócito em maturação, sendo sua matriz extracelular constituída por glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 e ZP3, presentes em todas as espécies de mamíferos. As ZP1 e ZP2 são glicoproteínas estruturais, enquanto a ZP3 age como receptor espermático (HERRLER; BEIER, 2000). Apenas espermatozoides com acrossomas intactos podem se ligar à ZP3. A ligação da cabeça espermática à ZP3 permite interações com outras zonas competentes que estimulam a ativação do acrossoma, liberando enzimas que digerem uma abertura através da zona pelúcida para atingir a membrana vitelínica (KLINE, 2000). A região equatorial da cabeça espermática liga-se à membrana vitelínica estimulando a retomada da segunda divisão meiótica, liberando o segundo corpúsculo polar (GINTHER, 1992; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O início da fecundação é um processo controlado, rigorosamente dependente da integridade nuclear e estrutural do oócito maturado e da penetração pelo espermatozoide. A fecundação induz uma série de oscilações (ondas) intracelulares de Ca^{+2} que promovem alterações citoplasmáticas e nucleares do oócito, essenciais para o início da embriogênese. Dentre as principais funções destas elevações periódicas do íon Ca^{+2} estão: a exocitose dos grânulos corticais, a ativação oocitária e a liberação do segundo corpúsculo polar, assim completando a segunda divisão meiótica e a preparação para a

primeira clivagem embrionária. Estas ondas de Ca^{+2} no oócito são originadas dos estoques intracelulares, localizados no retículo endoplasmático. No momento da penetração pelo espermatozoide, uma cascata de eventos se desencadeia, culminando com a formação do inositol trifosfato (IP3) que induzirá a liberação de Ca^{+2} (JONES et al., 1998).

No primeiro pico, a onda se inicia no sítio da penetração do espermatozoide no oócito e migra, pelo citoplasma, para o pólo oposto. Já nos demais ciclos, as ondas se iniciam no córtex do oócito no hemisfério oposto ao fuso da meiose, em seguida, propagando-se para todo o citoplasma. O aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} é pulsátil e periódico, pois o mesmo, em altas concentrações, por longos períodos de tempo, é citotóxico e prejudica a organização dos fusos, afetando a formação dos pronúcleos e conseqüentemente a clivagem. Os picos de Ca^{+2} livre são importantes tanto na ativação do oócito quanto no desenvolvimento embrionário normal (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994).

2.7 Biologia Molecular

A reprodução é um dos principais aspectos na criação de equinos. Estudos foram realizados buscando correlação entre fatores ambientais, comportamentais e fisiológicos com a fertilidade de equinos. No entanto, pouco se sabe sobre os fatores genéticos que atuam na fertilidade (HINRICHS, 2013).

O sufixo 'omics' descreve o estudo de grandes conjuntos de dados dentro de nichos biológicos funcionais, ou o estudo holístico das interações intra-domínio, portanto é considerada biologia de alta dimensão. Isso foi facilitado pelos avanços em tecnologias de sequenciamento em massa e acompanhamento aprimorado capacidades de análise bioinformática. Embora as 'ômicas' tenham tradicionalmente girado em torno do dogma central da biologia – genômica, transcriptômica e proteômica, atenção crescente é sendo concedido a interdomínios de vários níveis interações, além do surgimento de domínios, incluindo epigenômica, interatômica, hormonômica, metabolômica e fenômica (SIMINTIRAS; FORDE, 2017).

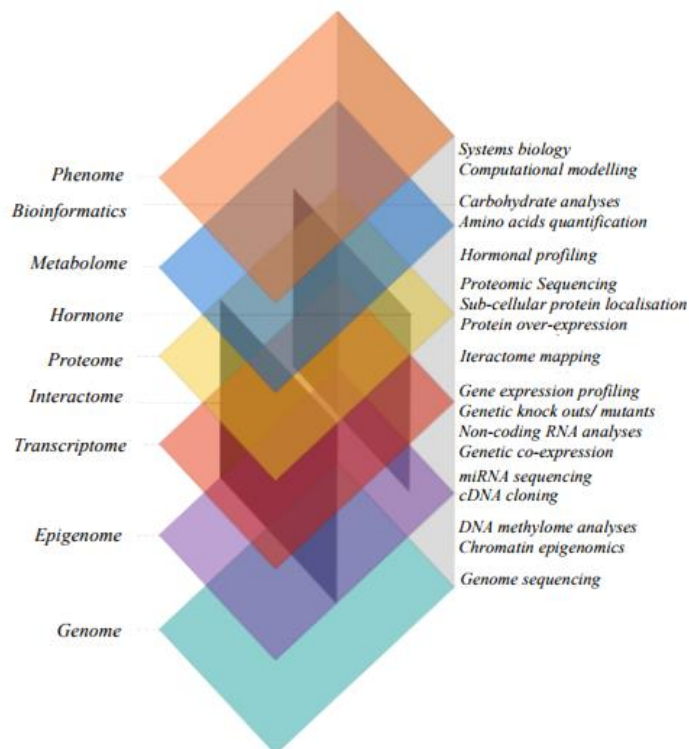


Fig. 1: Relação linear multinível entre domínios 'omics', com o correspondente comum disponível técnicas para estudar os respectivos domínios (SIMINTIRAS; FORDE, 2017).

A integração dos dados gerados a partir das várias plataformas "omics" , depende de um conhecimento da questão biológica que está sendo feita, ou seja, se está usando essas tecnologias como uma ferramenta de geração de hipóteses, ou para compreender melhor os fatores centrais para o sucesso da reprodução equina (SIMINTIRAS; FORDE, 2017).

2.7.1 Transcriptoma

A extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) é o primeiro passo para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular. É possível se obter DNA e RNA a partir de inúmeros tipos de tecidos e células, e existe uma infinidade de protocolos e reagentes para realização de tal procedimento (GOUVEIA; REGITANO, 2007). Modernas técnicas de Biologia Molecular vêm sendo utilizadas em estudos envolvendo a determinação da relação entre a ocorrência de variações no DNA com características fenotípicas, contribuindo para abordagens preventivas na medicina humana e animal (LEON, 2011).

O desenvolvimento recente do Sequenciamento de Segunda Geração permitiu aumentar a base de cobertura da sequencia de DNA, bem como

aumentar a amostra analisada. Isto facilitou o sequenciamento de transcritos de RNA na célula. Além dos mRNA, o RNA-Seq analisa populações diferentes de RNA como RNA total e pequenos RNAs como os microRNAs (mRNA), RNA transportador (tRNA) e RNA ribossômico (rRNA) (WANG et al., 2009; COSTA et al., 2010). O conhecimento de genes específicos do espermatozoide de humanos já está bem documentado (LAMBARD et al., 2004), enquanto poucos estudos estão disponíveis para equinos (CHOWDHARY et al., 2008).

Os espermatozoides maduros têm pouco citoplasma e uma cromatina altamente condensada enriquecida em protaminas. A presença de ácido ribonucleico (RNA) no espermatozoide ejaculado maduro foi demonstrada, pois ocorrem tanto a transcrição quanto a tradução, não no citoplasma dos espermatozoides maduros, mas nas mitocôndrias (BIANCHI et al., 2019). Os espermatozoides maduros contêm vários tipos de RNAs acumulados em seus núcleos mitocôndriais (BIANCHI et al., 2019). Inclui RNA mensageiro (mRNA), microRNA (miRNA), RNA de interferência (iRNA) e RNA antisens (HOSKEN et al., 2014). Após a fecundação, o espermatozoide fornece um genoma completo, altamente estruturado e marcado epigeneticamente que, junto com RNAs e proteínas, desempenha um papel distinto no desenvolvimento embrionário inicial (BIANCHI et al., 2019).

Apesar dos avanços obtidos na análise transcricional de espermatozoides em diversas espécies, os estudos genéticos de espermatozoides de garanhões ainda são limitados (SULIMAN et al., 2018). A análise do transcriptoma de espermatozoides de garanhões foi realizada por SULIMAN et al. (2018) e permitiu a comparação da abundância de genes entre garanhões férteis e subférteis.

2.7.2 Proteômica

A proteômica consiste na caracterização em larga escala de componentes proteicos de uma determinada célula, tecido ou fluido biológico. No entanto, a análise proteômica ultrapassa a simples listagem de proteínas e fornece indícios substanciais quanto à organização e dinâmica dos processos metabólicos, regulatórios e de sinalização pelos quais a célula se desenvolve (PANDEY; MANN, 2000).

Na década passada, a proteômica possibilitou o desenvolvimento de novas tecnologias na identificação de marcadores moleculares de patologias. O PS, assim como a membrana plasmática, são candidatos para a análise proteômica na avaliação da fertilidade masculina (MILARDI et al., 2013). O fluido das glândulas anexas contém diversas proteínas que são importantes no processo de fecundação e cerca de 35% destas macromoléculas da membrana plasmática são provenientes deste fluido (KOEHLER et al., 1980).

Durante a ejaculação, uma grande quantidade de proteínas do plasma seminal interage com a membrana espermática, levando a uma série de alterações bioquímicas e estruturais implicadas na função espermática e na interação dos gametas (GUASTI et al., 2020). A maioria das proteínas seminais na espécie equina pertence a três grupos, sendo estas proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs), proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2) e as espermedesinas (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

Os membros da família de proteínas CRISP (CRISP1, CRISP2, CRISP3) caracterizam-se pela presença de 16 resíduos de cisteína, ligados por pontes dissulfeto, subdividindo a molécula em três domínios (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Estas três proteínas foram identificadas no trato genital de equinos, humanos e roedores. A função dos diversos membros da família CRISP na reprodução parece estar relacionada com processos de espermiogênese, maturação do espermatozoide, capacitação espermática e na interação espermatozoide-ovócito (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Na ejaculação, as proteínas que contêm o domínio Fn-II, se unem ao espermatozoide mediante interações específicas com os resíduos de colina dos fosfolípidios da membrana do espermatozoide (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992), mediando a capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolípidios (THÉRIEN et al., 1999). Estas proteínas apresentam a capacidade de ligação à heparina. A heparina é um glicosaminoglicano, isto é, um polissacarídeo de alto peso molecular, que se liga ao espermatozoide bovino através de proteínas, e é capaz de induzir a capacitação (LENZ et al., 1983; MILLER et al., 1990). Tal efeito é obtido através da modulação na atividade da proteína à qual ela se liga. Glicosaminoglicanos semelhantes à heparina são secretados, particularmente na fase folicular, pelo trato reprodutivo da fêmea, o que estimula a capacitação

(LENZ et al., 1982). As proteínas do plasma seminal equino 2 (HSP-1) e proteínas do plasma seminal equino 2 (HSP-2), expressas na ampola do ducto deferente, pertencem ao grupo das proteínas com módulos Fn-2 e representam cerca de 70 a 80% das proteínas totais do PS equino. Estas proteínas são homólogas as proteínas de ligação a heparina do plasma seminal bovino (BSP), que estão envolvidas na capacitação espermática (EKHALASI-HUNDRIESER et al., 2005).

As espermedesinas são glicoproteínas de baixo peso molecular (12-16 kDa) compostas por 109 e 133 aminoácidos e constituídas estruturalmente por um único domínio que serve como suporte estrutural e ao qual se pode atribuir diferentes funcionalidades. Se aderem a membrana plasmática durante a ejaculação e são caracterizadas como proteínas multifuncionais, pois possuem propriedades de ligação a heparina, a inibidores de proteases, a fosfolípídeos e a carboidratos. Desta forma, podem exercer função como receptores no reconhecimento entre os gametas ou mediar a ligação espermática no epitélio da tuba uterina (ROMERO et al., 1997; TOPFER-PETERSEN et al., 1998; TOPFER-PETERSEN et al., 1999).

Proteínas no plasma seminal equino já foram identificadas como marcadores de fertilidade como: Seminal Plasma Proteins 1 (SP1) e Clusterin (Novak et al., 2010); marcadores de criopreservação como: Cysteine-rich Secretory Protein 3 (CRISP-3) e Horse Seminal Plasma Proteínas 2 (HSP-2) (JOBIM et al., 2011). Um estudo recente identificou as proteínas mais abundantes no PS. No total foram identificadas proteínas 24 proteínas no plasma seminal equino. As mais abundantes foram, HSP1, CRISP3 e calicreína 1E2 (KLK1E2). A prosaposina foi identificada no PS e pode desempenhar um papel no processo de fertilização. Dez proteínas do plasma seminal interagem com a membrana espermática e estão relacionadas a atividades de ligação e catalítica (clusterina, CRISP3, proteína 1 de ligação ao espermatozóide do epidídimo, KLK1E2, proteína A3 do plasma seminal e HSP1). Além disso, outras proteínas identificadas foram associadas à integridade do DNA, capacitação e reconhecimento da prenhez. Esses achados indicam que a ligação de proteínas específicas à membrana plasmática durante a ejaculação pode influenciar a sobrevivência espermática após a criopreservação e pode desempenhar um papel na diminuição da qualidade em garanhões com PS tóxico. A elucidação

dessas interações é um passo importante no entendimento dos processos biológicos relacionados à fertilidade equina e facilita futuras investigações sobre a seleção e aplicação de estratégias de sêmen de baixa congelabilidade (GUASTI et al., 2020).

A caracterização e identificação destas proteínas no plasma seminal e membrana plasmática permite elucidar os processos biológicos relacionados à fertilidade masculina e ao processo de fertilização, e após sua validação podem ser utilizadas na distinção clínica entre fertilidade e infertilidade. O estudo do proteoma da célula espermática é relativamente mais simples quando comparado ao de células somáticas. O espermatozoide é uma célula altamente especializada com o conteúdo mínimo de citosol e organelas (YANAGIMACHI et al., 1994), no entanto, possui maior quantidade de proteínas de membrana plasmática do que qualquer outro tipo celular (BREWIS; GADELLA, 2010).

2.7.3 Metabolômica

A metabolômica é uma das técnicas mais recentes que foi desenvolvida após a genômica, transcriptômica e proteômica para analisar todo o metaboloma, os produtos finais do metabolismo dentro de um sistema biológico (ZHANG et al., 2012). Os metabólitos são moléculas pequenas, com menos de 1 kDa derivadas de vias metabólicas, e incluem hormônios, aminoácidos, lipídios, carboidratos e nucleotídeos. A composição do metaboloma determina o estado fenotípico atual de uma célula e muda ativamente em resposta a estímulos celulares e extracelulares, tornando os estudos metabolômicos mais informativos do que as outras abordagens OMICS, particularmente na investigação da resposta celular a estímulos exógenos ou em caso de patologia (NICHOLSON et al., 1999).

Os metabólitos constituem um conjunto diverso de arranjos atômicos quando comparados com proteoma e transcriptoma e isto proporciona uma ampla variação nas propriedades físicas e químicas. O grau de diversidade é indicado pelas análises de metabólitos orgânicos com baixo peso molecular, polares e voláteis, como etanol e isopreno, até análises de metabólitos com maiores pesos moleculares, polares (carboidratos) e não polares (terpenóides e lipídeos) (DUNN; ELLIS, 2005).

A Metabolômica também pode ser dividida em duas categorias: “Targeted” (DUDLEY et al., 2010) e “Untargeted” (DE VOS et al., 2007) ou “Non-Targeted” (LIN et al., 2011); sendo que na primeira a análise é direcionada para moléculas alvos, que já são previamente conhecidas, enquanto que na segunda se faz um perfil (“profiling”) total dos metabólitos presentes no sistema.

Os metabólitos são o resultado de reações metabólicas associadas a várias vias bioquímicas (DUNN et al.; 2011). Muitas destas moléculas desempenham papéis importantes nos processos biológicos e representam potenciais biomarcadores para prever ou detectar estados de desenvolvimento, eventos fisiológicos, doenças ou fenótipos específicos. Portanto, a metabolômica é usada para entender as redes de metabólitos e fornecer ampla identificação e quantificação de pequenas moléculas, incluindo aminoácidos, peptídeos, vitaminas, minerais, lipídios e carboidratos em diversas células, tecidos, fluidos, órgãos e organismos (MOURA et al., 2018).

A cromatografia líquido acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (LC-QTOF-MS) apresenta um enorme potencial na análise qualitativa de contaminantes orgânicos em níveis de traços e ultratraços (mg L⁻¹, µg L⁻¹ e ng L⁻¹). A excelente precisão de massa juntamente com a aquisição de um conjunto de dados completo em relação aos componentes da amostra com alta sensibilidade facilita a realização de uma triagem ampla (GAVRILESCU et al., 2015).

Na ionização por Eletrospray Ionization (ESI), o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido passa através de um capilar, a vácuo, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“spray”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo. A ionização pode ser conduzida no modo positivo, onde o analito é carregado positivamente, e no modo negativo, onde é carregado negativamente. À medida em que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida, ocorrendo uma “explosão coulômbica”. Os íons gerados são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA et al., 2008).

À medida que os íons possuem a mesma energia, mas diferentes massas, estes chegarão ao coletor em momentos diferentes, dependendo da sua massa, carga e energia cinética. É possível que se obtenha numa mesma análise, dados de massa exata e de fragmentação dos compostos, através do modo bbCID (Broadband Collision Induced Dissociation – Bruker Daltonics). A análise de compostos no modo bbCID gera continuamente fragmentos de íons usando dissociação por colisão induzida (CHIARADIA et al., 2008).

Embora vários tipos de detectores permitam a análise de fluxo contínuo, o eluente da cromatografia líquida (LC) que transporta os analitos não pode fluir diretamente para o espectrômetro de massa. O sistema LC-MS e os espectrômetros de massa são acoplados através de uma interface (ou fonte de íons), e o LC é operado em contrapressões normais. O detector do espectrômetro de massa é operado sob vácuo. À medida que o eluente da coluna flui, o solvente é ionizado ou evaporado pela aplicação de voltagem e calor. As moléculas de analito carregadas são então introduzidas na interface; isso é essencial, pois o espectrômetro de massa pode detectar e medir apenas as partículas ionizadas. Como os íons do analito são criados à pressão atmosférica na interface, o processo é chamado de ionização por pressão atmosférica (API) e a interface é conhecida como fonte de API. Ionização Electrospray (ESI) e Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) são as fontes mais utilizadas em Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (NORTHEAST et al., 2022).

Os íons do analito são atraídos para o MS expostos a campos magnéticos e elétricos. As trajetórias de voo dos íons são transformadas alterando os campos aplicados, o que confere a separação entre eles com base em seus valores de massa para carga. Quando os íons separados atingem a superfície do multiplicador de elétrons (um dínodo), os elétrons secundários são liberados. Esses elétrons secundários são multiplicados fazendo-os fluir através de uma sequência de dínodos. A corrente amplificada produzida pelo fluxo dos elétrons secundários é medida e associada às intensidades dos íons no espectrômetro de massa em qualquer momento (Figura 2) (NORTHEAST et al., 2022).

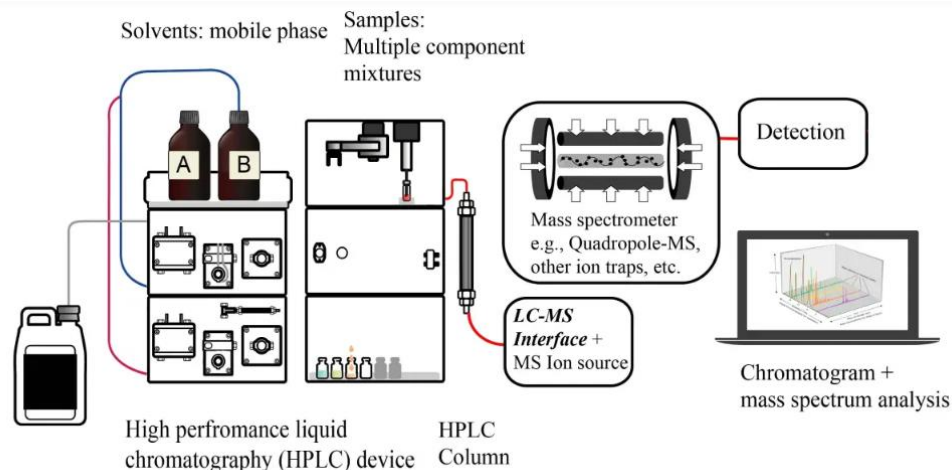


Fig. 2: Exemplo de diagrama gráfico de uma configuração de LC-MS (NorthEast et al., 2022).

As abundâncias dos íons quantificados durante a análise de uma amostra por LC-MS são descritas como um cromatograma total de íons (TIC). O espectro de massa exibe as abundâncias de íons versus os valores de m/z medidos (Figura 3). O espectro de massa de um composto fornece informações sobre a massa do composto original (a partir do valor m/z de seu íon). Informações estruturais adicionais sobre compostos de teste podem ser inferidas a partir das abundâncias comparativas de áreas de pico de massa isotópica espectrais. O pico do analito parental (m/z ou MRM) é usado para sua quantificação (NORTHEAST et al., 2022).

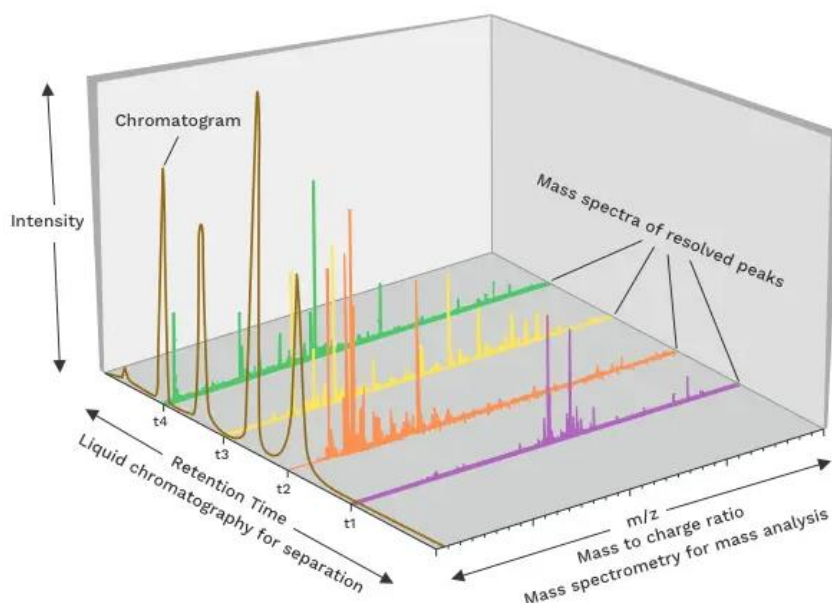


Fig. 3: Exemplo de gráfico de resultado da análise LC-MS (NORTHEAST et al., 2022). Este gráfico mostra as intensidades de pico dos íons do analito versus seu tempo de retenção. Além disso, cada ponto no cromatograma está relacionado com um espectro de massa.

Os experimentos de metabolômica fornecem resultados únicos para melhorar a compreensão das informações biológicas relacionadas ao metaboloma e mais comumente à genômica funcional (MOURA et al., 2018). O primeiro estudo metabolômico do PS foi publicado por Hamamah et al., [1993] e analisaram o perfil metabolômico do plasma seminal em pacientes inférteis com azoospermia obstrutiva, oligoastenoteratozoospermia e falência espermatogênica (HAMAMAH et al., 1993). Neste estudo os autores sugeriram que uma combinação de biomarcadores, como glicerilfosforiletanolamina – GPC, citrato e lactato, pode ser usada para diferenciar pacientes azoospermicos obstrutivos (HAMAMAH et al., 1993). Os outros metabólitos como alanina, tirosina e fenilalanina também foram relatados como alterados em pacientes inférteis normozoospermicos e oligozoospermicos (GUPTA et al., 2011). Xu et al., (2020) usaram a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para identificar a diferença no metaboloma seminal entre pacientes férteis e inférteis (XU et al., 2020). Um total de 63 metabólitos foram identificados como potenciais biomarcadores de infertilidade e 17 destes foram correlacionados com parâmetros do sêmen. A relação foi estabelecida entre acilcarnitinas e concentração espermática, motilidade espermática e níveis de

antioxidantes no sêmen. Além disso, as carnitinas envolvidas no processo de maturação espermática (NIEDERBERGER, 2005) também têm impacto no estresse oxidativo (DOBRAKOWSKI et al., 2017).

Sabe-se, também, que os metabólitos e suas funções em vias e eventos fisiológicos específicos, entre eles a fecundação, implantação e desenvolvimento embrionário, são essenciais para o sucesso reprodutivo (PAIVA et al., 2015; ZHOU et al., 2016).

Outros metabólitos, como alanina, tirosina e fenilalanina, também foram relatados como alterados em pacientes inférteis normozoospermicos e oligozoospermicos (GUPTA et al., 2011). A metabolômica do PS também foi investigada em várias condições relacionadas a anormalidades espermáticas. Jayaraman et al., (2014) usou ressonância magnética nuclear de prótons para analisar o metaboloma do plasma seminal de homens inférteis oligozoospermicos, astenozoospermicos, teratozoospermicos, azoospermicos e idiopáticos. Além dos metabólitos alterados, um perfil metabólico único foi identificado na infertilidade idiopática, caracterizado por níveis alterados de frutose, citrato e aminoácidos.

3 ARTIGO

Artigo para publicação na Theriogenology.

PROTEOMIC AND METABOLOMIC PROFILE OF EQUINE SEMINAL PLASMA

V.L.C. Bueno^{a,b*}, H.B.A. Bastos^a, E. Barros^c, C.J.R. López^c, P.M.P. Vidigal^c, H.J.O. Ramos^c, M.I.M. Jobim^b, R.C. Mattos^b, S.Fiala-Rechsteiner^{a,b}.

^a HISTOREP - Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas-RS, Brazil

^b REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

^c NuBioMol - Núcleo de Análise de Biomoléculas, UFV, Viçosa-MG, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308-6124; fax: +55 51 3308-8063 E-mail address: veronicalacruzbueno@hotmail.com (V.L.C Bueno).

Postal address: Avenida Bento Gonçalves, 9090, REPROLAB, cep. 91540-000, Porto Alegre - RS Brasil.

ABSTRACT

Seminal plasma (SP), the product of testes, epididymis, and accessory sex glands, is a fluid released during ejaculation and represents up to 98% total of the ejaculated volume in the stallion. The SP plays an essential role in reproduction as a transit medium and a source of energy, antioxidants, enzymes, and minerals. The present study aimed to investigate proteomics and metabolomics of the stallion seminal plasma. Twenty-four Criollo stallions with a known reproductive history and 30 inseminated mares at least were used. One ejaculate was collected from each stallion during the breeding season. Pregnancy rates ranged at day 16 after artificial insemination from 20.2% to 95.6%. The animals were divided into two groups: High Pregnancy (HP), with a pregnancy rate per cycle $\geq 51\%$, and Low Pregnancy (LP), with a pregnancy rate of $\leq 50\%$. Analysis of sperm concentration, kinetics, morphology, and plasma membrane integrity and functionality were performed. Proteins were separated using 2D SDS PAGE gel electrophoresis in duplicate.

The spectra were acquired in a nano LC-MS/MS spectrometer, and proteins were identified by the MASCOT application and validated by SCAFFOLD. The metabolic profile was acquired using UHPLC-QTOF-MS. From a total of 716 detected spots, 25 spots were identified with differences ($P < 0.05$) in abundance between in the HP group and LP group. A total of 18 target metabolites were identified. We showed proteins and metabolites with differences between groups and relation with the reproductive physiology of the stallion. Studying proteins and metabolites in SP may help us gain insight regarding the underlying molecular cause of certain unexplained cases of male subfertility and infertility. We may be able to develop biomarkers that can help to identify these individuals, enabling more specific management and development of a product that helps improve fertility in stallions.

1. Introduction

Stallions are selected as sires based on four qualities: pedigree, performance record, conformation and progeny [Varner et al., 2008a]; however, fertility or fertility potential is usually, at best, secondary considerations [Colenbrander et al., 2003]. Fertility can be determined by parameters that reflect breeding success rates [Hamann et al., 2005] or by using sperm characteristics, which demonstrate inconsistent results [Suliman et al., 2008]. Male fertility relates to the capacity of an animal to produce spermatozoa with the ability to fertilize the oocyte, resulting in a living offspring. It is affected by several factors, including management, nutrition, disease, stress, age, and genetics [Velho et al., 2018]. Pregnancy rates in managed horse populations depend on the innate fertility of the mares and stallions involved and on the quality of breeding management. Because a single stallion usually mates many mares, stallion fertility is a critical factor in the overall success of a breeding program [Colenbrander et al., 2003]. Poor reproductive performance in one stallion results in great economic impact by increasing the costs to produce foals. The standard breeding soundness examination is limited because it does not predict the fertility of any given stallion [Barrier-Battut, et al., 2016].

Seminal Plasma is the product of testes, epididymis, and accessory sex glands, is a fluid released during ejaculation representing up to 98% of the

volumin of the stallion ejaculate. SP plays an important role in reproduction not only as a carrier medium, but also as a source of energy, antioxidants, enzymes, and minerals. Micro and macro elements along with seminal enzymes, hormones, proteins, and lipids contained in SP are essential for the proper physiological function of spermatozoa [Tirpák et al., 2021].

SP contains different types of proteins that are mainly secreted by the epididymis and accessory glands, and most equine SP proteins belong to three groups: transporter proteins of two or four fibronectin type II (Fn-2) modules, cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) and spermadhesins. These proteins are implicated in the modulation of sperm protection by antioxidant mechanisms, sperm capacitation, acrosome reaction, sperm–oocyte fusion, gamete recognition and postcoital inflammatory response in the uterus of mares [Guasti et al., 2020]. Some proteins have already been identified as fertility markers: Seminal Plasma Proteins 1 (SP1); Clusterin [Novak et al., 2010] and cryopreservation markers: Cysteine-rich Secretory Protein 3 (CRISP-3); Horse Seminal Plasma Proteins 2 (HSP-2) [Jobim et al., 2011].

Metabolomics is one of most recent OMICS techniques that was developed after genomics, transcriptomics and proteomics. To analyze the entire metabolome, makes it possible to have access to the final products of the metabolism within a biological system. The metabolites are small molecules, less than 1 kDa derived from metabolic pathways, and include hormones, amino acids, lipids, carbohydrates and nucleotides. The composition of the metabolome determines the current phenotypic state of a cell and actively changes in response to cellular and extracellular stimuli, making metabolomic studies more informative than the other OMICS approaches, particularly in the investigation of cellular response to exogenous stimuli or in case of pathology [Nicholson et al., 1999]. The metabolomic profile of the SP was already analyzed in different species, as in humans [Hamamah et al., 1993], rhesus monkey [Lin et al., 2009], mouse [Binder et al., 2015], turkeys [Słowińska et al., 2017], bull [Velho et al., 2018], carp and rainbow trout [Dietrich et al., 2019], boar [Zhang et al., 2021], donkey [Castiglione et al., 2021], goat [Jia et al., 2021] and giant panda [Zhu et al., 2022].

Semen analysis, physical examination and laboratory work up cannot identify the etiology of infertility in 30% - 40% of cases, which are classified as

idiopathic. Therefore, the application of proteomics and metabolomics in the field of andrology will aid to overcome the limitations of the standard semen analysis. Understanding the molecular pathways associated with male infertility will help in planning ad hoc treatments, contributing to the clinical management of infertile patients [Panner Selvam et al., 2020]. The present study aimed to investigate the proteomics and metabolomics of the seminal plasma of stallions.

2. Materials and methods

2.1. Animals

A total of 24 Criollo stallions were used, with age ranging from 7 to 28 years old and weighing 450 to 500 Kg. Stallions were fed daily with concentrate, alfalfa hay, water *ad libitum* and mineral supplementation. Animals were housed in breeding centers in Rio Grande do Sul (30 °S, 51 °W), Brazil. The study was approved by the Committee of Ethical Use in Animal Experimentation at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil (protocol number 38666).

2.2. Semen Sample Collection

One ejaculate was collected from each stallion during the breeding season. All stallions were in reproductive activity. The sample collection occurred after two days of sexual rest, with an artificial vagina. With an in line Hilter immediately after collection, the ejaculate was filtered, placed in a Falcon® tube, and forwarded to the laboratory. For fresh semen analysis 1 mL of each ejaculate was used. The remaining ejaculate was used for molecular biology.

2.3. Pregnancy Rate

The selected stallions' fertility was evaluated through their reproductive history, based on pregnancy rate per cycle at the 16 th day after artificial insemination with at least 30 inseminated mares per stallion. At least two breeding seasons were considered. Pregnancy rates ranged from 20.2 % to

95.6% and the animals were divided into two groups: Group High pregnancy rates (HP), with pregnancy rate per cycle over 51 % and Group Low pregnancy (LP), with pregnancy rate per cycle equal or below 50 %.

2.4. Semen Analysis

Sperm concentration was determined using a Neubauer chamber. Total Motility (%) (TM); Progressive Motility (%) (PM); Fast Motility (%) (FM); Slow Motility (%) (SM); Local Motility (%) (LM); Average Path Velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$); Straight Line Velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$); Curvilinear Velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$); Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH, μm); Beat Cross Frequency (BCF, Hz); Straightness (STR, %) (VSL/VAP); Linearity (LIN, %) (VSL/VCL) were evaluated via CASA system (Computer Assisted Sperm Analysis, Tiefenbach, Germany, AndroVision®, Minitube). Physical integrity of the plasmatic membrane was analyzed by incubating 400 μL of semen with 3 μL of propidium iodide (PI) and 2 μL of carboxyfluorescein diacetate (CFDA) at 37 °C for eight minutes. The samples were evaluated by epifluorescence microscopy (1000x). A total of 100 spermatozoa per sample were evaluated. Cells with green staining were considered intact sperm, while cells stained red were considered damaged [Larentis et al., 2018]. Functional integrity of the plasma membrane was assessed using the hypoosmotic-swelling test (HOST), 200 μL of distilled water were added to 100 μL of semen (osmolarity: 100 mOsmol kg^{-1}) and incubated at 37°C, for five min. Samples were analyzed in a phase contrast microscope (400x). A total of 200 spermatozoa were evaluated per sample, and cells with coiled tails were considered intact [Lagares et al., 1998]. Sperm morphology was evaluated with Diff-Quick stain (Laborclin, Brazil): slides with smear samples of semen were immersed in each stain for ten seconds, washed and being immediately analyzed with an optical microscope with an immersion objective (1000x). One hundred sperm cells were counted from each sample. Sperm cells defects were classified as either major or minor in terms of their perceived adverse effects upon male fertility [Blom, 1973].

2.5. Sample Acquisition for proteomics

After, the remaining sample for sperm cells analysis was transferred to Falcon® tubes (15 mL) and centrifuged at 400 x *g* for 10 min. Supernatant SP was then transferred to a 2 mL microcentrifuge tube, and centrifuged again (10.000 x *g*, 60 min, 4°C). The supernatant was stored in RNase-free cryotubes at -80°C for later analysis [Velho et al., 2018].

2.6. Sample Acquisition for metabolomics

The seminal plasma was thawed at room temperature, mixed 1:1 with deionized water, after filtered with 0.45 µm filters to remove cell sediments. Each sample was filtered again through a 0.22 µm syringe filter prior to profile acquisition [Wijnant et al., 2020]. The seminal plasma samples were transported on dry ice to the Laboratory Biotechnology Center (Cbiot) of UFRGS where the identification of metabolites was performed.

2.7. Electrophoresis

Protein contents from the seminal plasma samples were determined by the Bradford method [Bradford et al., 1976], using 1 mg/mL of BSA (A7906; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) as standard. Proteins were separated using two dimensional gel electrophoresis in duplicate. In summary, samples containing 250 µg of total protein were mixed with buffer (7-M urea, 2-M thiourea), 0,5% free ampholytes (IPG buffer, pH 3-10 [GE Life Sciences, Piscataway, NJ, USA]), 2 % dithiothreitol (DTT), 2% CHAPS, and traces of bromophenol blue. Initially, the strips were rehydrated for 16 h in 250 µL rehydration solution at room temperature in IPG Box (GE Life Sciences). Then, samples were incubated in 13-cm IPG Strips (pH 3-10 not linear, GE Life Sciences). Isoelectric focusing was carried out in Ettan IPGphor III System (GE Life Sciences) with the following conditions: 500 V (500 V/h), 1000 V (800 V/h), 8000 V (11300 V/h), 8000 V (5400 V/h). The current limit was 50 mA per strip.

For the second dimension, strips containing plasma proteins were incubated for 20 min in equilibration buffer I (75-mM Tris-HCl, pH 8.8, 6-M urea,

29.3 % glycerol, 2 % SDS, 2 % DTT) and equilibrated for an additional 20 min in buffer II (similar to buffer I, but containing 2.5 % iodoacetamide instead of DTT). Subsequently, the strips were placed on top of 1.5 mm thick 12.5 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels and the proteins were separated using SE 600 Ruby system (GE Life Science) at 10 °C. Electrophoresis was performed with 15 mA for 15 min per plate followed by 40 mA per plate, for 3 h (Electrophoresis Power Supply 301; Amersham Pharmacia Biotech).

Gels were stained in colloidal Coomassie blue with modifications (Van et al., 2013). Gels were washed three times (20 min each) in a solution containing phosphoric acid (2 %) and ethanol (30 %); another three washes in 2 % phosphoric acid, and then put in a solution with phosphoric acid (2%), ethanol (18 %), and ammonium sulfate (15 %) added with 5 mL of a Coomassie Blue G-250 solution (2 %) for 60 h. Gels were washed for 24 h with distilled water and stored in acetic acid 5 %. Two-dimensional gels were scanned using the ImageScanner III (GE Life Sciences) at 300 dpi and analyzed to determine relative volume of each spot considering the volume over all the spots in the image using software ImageMaster™ 2D Platinum (version 7.0; GE Life Sciences). Proteins in key regions were used as landmarks, and final spot matches were organized by checking each spot in each gel with the respective pattern [Bastos et al., 2019].

2.8. Spot selection criteria

Spots were selected by presence in at least 80% of SP gels in one of the groups, significant abundance ($P < 0.05$) with minimum of 1.5-fold magnitude difference between groups using ImageMaster™ 2D Platinum (version 7.0; GE Life Sciences). After selection of spots, the samples were transported to the Biomolecule Analysis Center (NuBioMol) at Universidade Federal de Viçosa for the proteins identification and characterization.

2.9. In-gel tryptic digestion

After separating the proteins by SDS-PAGE 2DE, the spots that showed differences in abundance were excised and the proteins immobilized in them

were subjected to enzymatic digestion [Shevchenko et al., 2006]. Briefly, the gel fragments were placed in 600 μ L microtubes containing 200 μ L of 50% (v/v) acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate pH 8.0, which were subjected to washing to remove dye and SDS. Next, the gels were dehydrated by adding 200 μ L of 100% acetonitrile twice to each microtube, keeping them at rest for 5 min. The fragments of the gels were dried for 15 min in a vacuum centrifuge system, model AG-22331 (Eppendorf, Germany). The proteins present in the gel fragments were reduced in 100 μ L of 65 mM DTT in 100mM ammonium bicarbonate, pH 8.0, at 56°C for 30 min. Then, the proteins were alkylated with 100 μ L of 200mM iodoacetamide in 100mM ammonium bicarbonate, pH 8.0, at room temperature, for 30 min in the dark. Subsequently, the gel fragments were washed, hydrated and dehydrated with ammonium bicarbonate and acetonitrile, respectively, whose steps were repeated twice. Finally, they were dried in a previously referenced vacuum centrifuge system. In the proteolysis step, the fragments of the gels were rehydrated in an ice bath, applying 100 μ L of porcine pancreas trypsin solution, indicated for use in proteomics, treated with TPCK, reference T6567 (Sigma-Aldrich, USA), at a final concentration of 25 ng/ μ L in activation solution (40 mM ammonium bicarbonate, pH 8.0, and 10% acetonitrile). After 45 min on ice, 100 μ L of activation solution were added to the tubes containing the gel fragments. Samples were placed in a water bath at 37°C for 22 h. After proteolysis, the samples were sonicated for 10 min, shaken for 20 sec and the solution was transferred to a clean microtube. Next, 150 μ L of the solution containing 5% (v/v) formic acid in 50% (v/v) acetonitrile were added to the remaining gels. Each tube was stirred for 20 sec, kept at room temperature for 15 min and sonicated for 2 min. The solution was removed and transferred to the microtube containing the previously reserved solution. This step was repeated once more, the solution was collected and added to the aforementioned microtube. The samples containing the peptides were concentrated in a vacuum centrifugation system and stored in a -20°C freezer until desalting. The tryptic peptides from each sample were resuspended in 10 μ L of trifluoroacetic acid – 0.1% TFA. Then, they were desalted using C18 reverse phase micro columns model ZTC18S096 (Millipore, USA). The process was carried out according to the instructions provided by the manufacturer. Briefly, the desalination process occurred through the following stages: a) activation of the stationary phase (C18

present in the tip), using 100% acetonitrile; b) stationary phase equilibration using 0.1% TFA solution; c) sample loading; d) sample desalination, using 0.1% TFA solution; e) sample elution using 100% acetonitrile; and f) washing the stationary phase using 100% acetonitrile. After elution, the peptide solution was concentrated in a vacuum centrifuge system. The samples were dried and stored in a -20°C freezer until analysis by mass spectrometry.

2.10. Acquisition of mass spectra by LC-MS/MS

The tryptic peptides were solubilized in 80 µL of 0.1% formic acid aqueous solution, LCMS purity grade and packed in appropriate tubes for application in the nano LC-MS/MS system used. The analyzes were carried out in an LC-MS/MS system, composed of a nanoAcquity UPLC (Waters, USA) and an Amazon Ion Trap[®] mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). The samples were subjected to chromatographic analysis on a trap column and a C18 BEH130 capillary column 1.7 µm – 100 µm x 100 mm, operating with a flow rate of 0.400 µL/min. The peptides were automatically eluted and injected into a mass spectrometer, operating in online mode, with the aid of a nanoESI ionization needle. The mobile phase in the chromatographic analysis consisted of solutions of water and formic acid 0.1% (v/v) (Solvent A) and acetonitrile and formic acid 0.1% (v/v) (Solvent B), through the following schedule: starting with the desalting step with 5% maintenance of (B) for 5 min, then a gradient consisting of a linear ascent ramp from 5% to 50% of (B) for 40 min, maintenance 50% of (B) for 5 min, and a linear ascent ramp starting from 50% to 90% of (B) for 10 min, maintenance of 90 % of (B) for 5 min, linear descent ramp starting from 90% to 10% of (B) for 5 min, followed by holding 10% of (B) for 5 min, making the total programming time approximately 75 minutes. Ions were scanned in positive mode for MS1 spectra in the mass range between 300 and 1500 m/z and MS2 between 70 and 3000 m/z. The IonTrap spectrometer was operated in auto-MSn mode, which acquired MS2 spectra for the most intense ions in each full scan spectrum, excluding single charged ions. Data acquisition was managed by the Hystar application, version 3.2 (Bruker Daltonics, Germany). The mass spectra were processed with the aid of Data Analysis software, version 4.0 (Bruker Daltonics, Germany), using default settings for proteomics. The peak lists

were generated in the extensible mark-up language (*.mzXML) format by the CompassXport application, version 3.0 (Bruker Daltonics, Germany).

2.11. Protein identification and characterization

The mass lists were compared to the Equidae family protein sequences, available in the UNIPROT Knowledgebase [UniProtKB, <http://www.uniprot.org/>; downloaded on 03/03/2016, with 29,048 entries], using the Mascot Daemon software, version 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). The Mascot search parameters were: enzymatic digestion by the trypsin with one missed cleavage (allowing an error tolerance of 0.2 Da for the parental ion and 0.5 Da for the fragments), carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and oxidation of methionine as a variable modification. The proteins identified by Mascot that were annotated as “Uncharacterized” in Equidae database were also analyzed using BLAST software, version 2.4.0 [Altschul et al., 1990]. In this analysis the “Uncharacterized” proteins were aligned to the proteins of the NCBI protein non-redundant database (E-value threshold 1 E10). The Scaffold software, version 3.6.4 (Proteome Software INC., Portland, OR) was used to validate Mascot results by applying the Peptide Prophet [Keller A et al., 2002] and the Protein Prophet algorithms [Nesvizhskii et al. 2003]. The proteins were statistically validated when the probability of identity was equal or above 90 %. A functional classification of the identified and statistically validated proteins was also performed by comparing their sequences with the Eukaryotic Orthologous Groups of proteins database (KOG) [Tatusov et al., 2003]. In this classification, a KOG ID was assigned to each protein that significantly aligned (E-value threshold 1 E10) with those deposited in that database, using the Reverse Position Specific BLAST (RPS-BLAST) [Marchler-Bauer et al., 2002; Schaffer et al., 1999].

2.12. Ultra-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer with time-of-flight analyzer (UHPLC-QTOF-MS).

All the 24 samples were injected at the same time, prepared in the exact same way. Chromatography was performed using Kinetex[®] Phenyl-Hexyl analytical column (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) with binary mobile phase at a flow of

350 $\mu\text{L min}^{-1}$ and injection volume of 10 μL . Mobile phase component A was acetonitrile with 0.1% formic acid and component B was aqueous solution with 0.1% formic acid. To perform the chromatographic separation, the following gradient for B was used: 95-5% for 12 min, 5% for 2 min, 5-95% for 2 min. Re-equilibration was achieved within 4 min, totaling 20 minutes of analysis. The LC-QTOF-MS system was a Nexera x2 liquid chromatograph (Shimadzu) coupled to an Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). The software utilized for system operation and data acquisition were DataAnalysis 4.2. TOF-MS and bbCID (MSMS/MS) data were acquired in the m/z range of 50 to 1000 Da. Ionization was performed by Electrospray (ESI) in positive and negative mode. The capillary voltage of the ion source was 4000 V for positive mode and 2500V for negative mode. The nebulizer gas pressure was 5.0 bar and the drying gas flow rate was 9.0 L min^{-1} . Nitrogen was used for both the nebulizer and the drying gas. The drying gas temperature was 210°C. The source transfer time was 50 μs and the pre-pulse storage time was 5 μs . The full scan collision energy was set to 10 eV and the collision energy in bbCID was set to 20 - 40 eV. In bbCID, precursor ions were fragmented in the collision cell without preselection. By switching the acquisition between MS and bbCID conditions, both high and low collision energy data sets were collected simultaneously. External calibration of the instrument was performed with a 10 mM sodium formate solution. Parameter settings for LC-QTOF-MS analyzes were optimized by injecting a mixed solution of the standards at concentrations of 2 mg L^{-1} of each compound.

2.13. Identification of metabolites

The software used for data acquisition was Compass Hystar 3.2 and Data Analysis 4.2 software (Bruker Daltonics, Germany) was used for post-analysis data processing. Compound identification criteria were based on the molecular formula and exact mass of each compound with a maximum mass error of 0,05 mDa. Considering that all samples were injected on the same day, the areas of the compounds were previously normalized so that the size of the area of the different compounds could be compared.

2.14. Statistical Analysis

Animals were divided into two groups: Group HP, with pregnancy rate per cycle $\geq 51\%$ and Group LP, with pregnancy rate per cycle $\leq 50\%$. The mean and standard error of all variables analyzed were performed and correlation between pregnancy rates and seminal parameters (TM, PM, FM, SM; LM; VAP; VSL; VCL; ALH; BCF; STR; LIN), plasma membrane integrity and functionality, major and minor defects, seminal plasma proteins and metabolites. The Shapiro-Wilk Test was used with the aim of evaluating data distribution of the seminal plasma proteomics and metabolomics. For non-parametric data the test used as the Kruskal Wallis and parametric data was analyzed by ANOVA and Tukey followed by Post-hoc test. For the other statistical analysis, Pearson's correlation was used, with a significance level of $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Protein identification

A total of 716 spots were detected, with molecular weight ranging from 12 to 225 kDa. A total of 25 spots with differences ($P < 0.05$) in abundance between in the HP group and LP group were detected and identified (Figure 4 and Figure 5). Twenty-five spots were analyzed in the LC-MS/MS mass spectrometer, of which 26 had their proteins identified by the MASCOT application and validated by SCAFFOLD, following the parameters described in Table 1. Two proteins were identified as "Uncharacterized", whose sequences were confronted by BLASTP and the result can be seen in Table 2. It is noted that the same protein was identified in more than one spot, which can be considered reasonable, considering that a protein can present several isoforms. Thus, an evaluation between the identified and validated proteins and the location of their spots was performed. The results observed from the correlations in the present study, among seminal parameters, conception rate and the relative abundance of protein are presented in Table 3. The mean relative abundance of proteins with higher abundance in the seminal plasma in the HP and LP group are presented in Figures 6 and 7. The seminal plasma protein HSP-1-like (HSP 1) showed a

trend of higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group. The Uncharacterized protein (accession number A0A3Q2I1A3_HORSE spot 77), Kallikrein-1E2 (KLK1E2), Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding, Uncharacterized protein (accession number A0A3Q2I1A3_HORSE spot 100), Cysteine-rich secretory protein 2, Albumin (spot 107), Polymeric immunoglobulin receptor, Keratin and Ig-like domain-containing protein) were the proteins that showed of higher area in the HP group than LP. The proteins Cysteine-rich secretory protein 3, Albumin (Spot 78), Carbohydrate-binding protein AQN-1, Carbohydrate-binding protein AQN-1, Clusterin, Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding, Binder of sperm 2, Cathepsin L1 and BPI fold-containing family A member showed of higher abundance in the LP group than HP.

3.2 Metabolomic identification

A total of 18 metabolites were identified after by UHPLC-qTOF-MS analysis of these seminal plasma samples. The identified metabolites were: tryptophan, lactic acid, ornithine, stearic acid, oleic acid, palmitic acid, melatonin, acetyl carnitine, carnitine, phenylalanine, isoleucine-leucine, sovalerylcarnitine, carnitine, citric acid, hippuric acid, 1,3-dioxan-5-ol, taurine, phosphoric acid and fructose. The results observed from the correlations in the present study, among seminal parameters, conception rate and the relative area of metabolites are presented in Table 4. The oleic acid and isoleucine were the metabolites that showed a higher area in the LP group ($P < 0.05$). The metabolites taurine and phosphoric acid showed a higher area in the HP group ($P < 0.05$). The mean relative area of metabolites with higher abundance in the seminal plasma in the HP and LP group are presented in Figure 8.

4. Discussion

Poor fertility of breeding stallions is a recognised problem in the equine industry. Stallion fertility is of high economic importance for the horse industry. Among farm animals, horses have the lowest reproductive rate [Suliman et al., 2018]. The conventional approach to evaluation of stallion semen dates back several decades, and includes evaluation of spermatozoa concentration, semen

volume, spermatozoon morphological characteristics, and spermatozoal motility patterns initially and following in-vitro storage. While an analysis performed in this manner does have predictive value, incorporation of some more newly developed techniques may improve the predictive value of the examination [Varner, 2008b].

The panel of proteins identified in seminal plasma ranges from various hormones, enzymes, inhibitors of proteinases and other components, growth factors to proteins and glycoproteins of still unknown nature or function. Composition and its effects on the fertilising ability of sperm seem to vary depending on the fertility of an individual animal [Töpfer-Petersen et al., 2005].

Two Kallikrein-1E2 (KLK1E2) proteins showed positive correlation with sperm with major defects. Previous studies have reported that KLK1E2 in seminal plasma was identified as being negatively related to fertility [Novak et al., 2010; Jobim et al., 2011]. However, all KLK1E2 identified showed greater abundance within the seminal plasma in stallion HP than LP. The abundance pattern was corroborated by accompanying studies at the protein level, which detected proteins with slightly differing molecular masses along the equine male genital tract [Jobim et al., 2011], which agrees with the present results. KLK1E2 is a member of the mammalian serine protease gene and is regulated by androgens. KLK1E2 is one of the major proteins found in equine seminal plasma [Guasti et al., 2020]. Correlations were observed between KLK1E2 activity in seminal plasma and sperm motility in bovine sêmem [Somlev; Karcheva 1996]. Protein expression KLK1E2 was correlated with sperm motility parameters (total motility and progressive motility) during the season. No significant correlations were found between the expression of albumin or KLK1E2 and sperm motility parameters during the non-breeding seasons [Mogielnicka-Brzozowska et al., 2019]. Recently, a work was published relating seasonality to Kallikrein abundance in the equine SP. Mangalarga Marchador stallions were monitored over 1 year regarding semen quality and seminal plasma proteome. KLK1E2 proteoforms in seminal plasma are involved in climate conditioning of reproduction. This work showed that, for fertile stallions, KLK1E2 present greater abundance in the breeding season than in the non-breeding season. The KLK1E2 act in response to the presence of steroids and other hormones. In this work, for fertile stallions, the morphological and physical–chemical factors suggest that the KLK1E2 proteoforms are conditioned by the climate or climatic

season. In the breeding season (spring–summer), the highest abundances of KLK1E2 in seminal plasma were accompanied by greater volumes of semen, higher concentrations of glucose and cholesterol and a higher number of protein spots in 2-DE gels [Senra et al., 2022]. These data corroborate with our study, as all stallions were collected during the breeding season (spring–summer).

Then Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP3) showed negative correlation with fertility and total motility and positive correlation with immobile spermatozoa. The CRISP-3 is present in large amounts in the seminal plasma of stallions. This protein is synthesized in great amounts in the accessory sexual glands, ampulla and seminal vesicle, thus allowing the isolation of equine CRISP-3 in amounts suitable for biochemical, physiological and structural studies from stallion semen [Schambony et al., 1998]. The CRISP3 was correlated with fresh semen quality, post thawing semen quality, fertility and indicated as a marker of stallion fertility [Novak et al., 2010; Jobim et al., 2011; Guasti et al., 2020]. Jobim et al. [2011] identified two CRISP3, the first was related to high sperm freezability (80 – 85 kDa, pI 7.54) and the second showed low sperm freezability (25 kDa, pI 7.54). However Novak et al., [2010] identified CRISP3 protein with kDa and pI similar to the second protein identified by Jobim et al., [2011] and related it to high fertility in stallions. These conflicting results can be explained by one study. In this research Stallions heterozygous for the CRISP3 c.+622G>A Single nucleotide polymorphism had lower fertility than homozygous stallions ($P = 0.0234$). The pregnancy rate per cycle in these stallions was estimated to be 7% lower than in stallions homozygous at this position. This association analysis suggests that homozygosity for the c.+622G allele in the CRISP3 gene might confer a higher fertility in breeding stallions [Hamann et al., 2007].

Albumin (Spot 78) showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion LP group than HP and demonstrated positive correlation with sperm with major defects. Albumin (spot 107), was the protein that showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group than LP. These results showed the different functions to isoforms proteins. Albumin is one of the most abundant components of stallion epididymal fluid [Fouchécourt et al., 2000]. In the male reproductive tract, albumin may be involved in the transport of other molecules to the sperm membrane during epididymal maturation, in the movement of proteins during the acrosomal reaction, or in membrane remodeling

during sperm oocyte membrane fusion [Arroteia et al., 2012]. This multifunctionality likely results from albumin's ability to interact with several components presently described in the seminal plasma, such as apolipoprotein A-I, serpin peptidase inhibitor and transferrin [Rego et al., 2014].

Cysteine-rich secretory protein 2 [CRISP-2] showed positive correlation with age and showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group than LP. CRISP-2 is expressed in the testis, epididymis and vesicular glands [Schambony et al., 1998]. According to [Topfer-Petersen et al., 2005] complete loss of CRISP 2 expression was observed in the testis and epididymis of a cryptorchid stallion.

Carbohydrate-binding protein AQN-1 showed positive correlation with age and showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group than LP. The AQN-1 are sperm-binding proteins, which appear to be involved in the carbohydrate-mediated steps of fertilisation. AQN-type proteins associate to the sperm surface at ejaculation predominantly at the acrosomal region of the sperm head and have been shown to contribute to the formation of the oviductal sperm reservoir by interacting with the glycoconjugates of the oviductal epithelium [Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005].

Zinc-2-alpha glycoprotein (AZGP1) is secreted by the prostate [Wang et al., 2013] and has been found localised on the pre-equatorial region including the acrosome, neck and middle piece of the flagellum in ram [Magargee et al., 1998]. Two AZGP1 showed negative correlation, the spot 89 with total volume of ejaculate and spot 90 with linearity. In addition the spot 90 were the proteins that showed higher abundance in the seminal plasma in stallion HP group and spot 89 showed higher abundance in the seminal plasma in stallion LP group. AZGP1 has been identified as an activator and intracellular modulator of sperm motility [Magargee et al., 1998].

Clusterin presented negative correlation with linearity and the proteins that showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group than LP. The highest tissue concentrations of Clusterin are present in the testis and epididymis; Sertoli cells may be the testicular source of Clusterin. It is involved in sperm maturation and possesses heparin-binding sites [Jobim et al., 2005]. Clusterin protects cells against apoptosis and against complement-induced cytolysis. It is possible that seminal plasma Clusterin interacts with the

membrane of injured spermatozoa in an attempt to rescue them [Guasti, et al., 2020]. Jobim et al., [2005] suggested that this protein, present in bull seminal plasma, is related to high semen freezability. Considering a study that reported different level of Clusterin in seminal fluid of fertile patients was 48.3 - 38.6 ng/ml and in infertile patients was 15.5 - 9.7 ng/ml [Salehi et al., 2013].

Equine seminal plasma proteins 1 (HSP-1) and equine seminal plasma proteins 2 (HSP-2), expressed in the ampulla of the vas deferens, belong to the group of proteins with Fn-2 modules and represent about 70 to 80% of total proteins in equine seminal plasma. These proteins are homologous to bovine seminal plasma heparin binding proteins (BSP), which are involved in sperm capacitation [Ekhalasi-Hundrieser et al., 2005]. The Seminal plasma protein HSP-1-like (HSP 1), which showed a trend higher abundance in the seminal plasma in the stallion LP group than HP. According with our data, HSP-1 protein has been previously reported in equine seminal plasma and its negative relationship with fertility and freezability has been proven [Novak et al., 2010; Jobim et al., 2011].

Cathepsin L1 showed positive correlation with normal sperm and the proteins that showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group than LP. Cathepsins participate in protein degradation and activation of enzyme precursors [Barrett, 1981; Rego et al., 2014]. A previous study showed that the expression of Cathepsins in cauda epididymal fluid is greater in dairy bulls with high fertility [Moura et al., 2006].

Several studies have suggested a role for members of the secreted phospholipase A2 (sPLA2) family in capacitation, acrosome reaction (AR), and fertilization, but the molecular nature of these enzymes and their specific roles have remained elusive [Escoffier et al., 2010]. Phospholipase A2 showed negative correlation with sperm concentration and showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group. Corroborating with our data the sPLA2 is fertility-associated biomarkers in both seminal plasma and serum of dromedary camels. The PLA2 plays an essential role in the late maturational events of spermatozoa, the acrosomal reaction, and sperm egg fusion [Waheed et al., 2015].

Polymeric immunoglobulin receptors showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group. It is a membrane protein synthesized in

a rough endoplasmic reticulum. In equines it mediates transcytosis or the transcellular transport of polymeric IgA and IgM, ensuring efficient secretion of these immunoglobulins in the mucosal surface either by covalent and non-covalent interactions [Vieira et al., 2021]. In humans it is expressed in the prostate and urethral glands and mediates the translocation of immunoglobulin A in the male genital tract [Cunningham et al., 2008].

Binder of sperm (BSP) proteins are ubiquitous among mammals and have been extensively investigated over the last three decades. Studies towards elucidating the biological role of BSP proteins revealed that these proteins were secreted by seminal vesicles and that they bind to the sperm surface at ejaculation [Manjunath; Thérien, 2002]. In addition to playing a major role in sperm capacitation, they are implicated as molecular chaperones in sperm motility and viability, in the formation of the oviductal sperm reservoir, in the regulation of cell volume and possibly in the interaction between sperm and oocytes, making them crucial multifunctional proteins [Plante et al., 2016]. Our showed Binder of sperm 2 showed of higher abundance in the seminal plasma in the stallion LP group than HP.

Bulbourethral glands secrete seminal plasma proteins with antimicrobial activity to seminal plasma, such as BPI fold-containing family A member 1 (BPI) [Vvan Tilburg et al. 2020]. The BPI showed, of higher abundance in the seminal plasma in the stallion LP group. In humans, it has been identified to be secreted into the epididymal lumen, binding to the acrosome membrane in higher levels in subjects with high seminal lipid peroxidation [Intasqui et al., 2015]. The protein has been identified in SP from rams [Martins et al., 2013] and is overexpressed in rams with higher sperm preservation ability [Boe-Hansen et al., 2020; Soleilhavoup et al., 2014].

The Keratin showed positive correlation with age and circular motility, showing higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group. Keratin proteins protect epithelial cells against mechanical and non-mechanical stresses [Gu et al., 2007]. Interestingly, keratin proteins also participate in regulating cell motility, may be also sperm motility [Pérez-Patiño et al., 2018]. There is few data available for the potential role of keratin in the genital system [Gouletsou et al., 2022]. Keratin, type II cytoskeletal 6A (accession no. M0QVY0) and keratin, type II cytoskeletal 1 (accession no. G3N0V2) were proteins

identified as unique to plasma exosomes from high-fertility heifers [Koh et al., 2018].

The Ig-like domain-containing protein is related to immune and inflammatory modulation [Menezes et al., 2020]. This protein showed positive correlation with age and negative correlation with sperm concentration. Also showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group. In boar, it was designated as a cooling biomarker at 5°C could. Because can disrupt key cellular pathways during spermatogenesis and epididymal maturation, resulting in altered sperm resistance to chilling injury [Menezes et al., 2020]. Ig-like domain-containing protein showed positive correlation with age and negative correlation with sperm concentration. Showed higher abundance in the seminal plasma in the stallion HP group.

The oleic acid and isoleucine were the metabolites that showed a higher area in the LP group than HP. These results agrees with studies in men, asthenozoospermia presents greater amounts of the oleic acid levels when compared to normozoospermic men [Khosrowbeygi et al., 2007; Gulaya et al., 2001]. Among the differential biomarkers, high-fertility bulls exhibited low levels of isoleucine [Kumar et al., 2015]. The amino acid isoleucine is responsible for delaying calcium uptake by ejaculated sperm by altering active calcium transport across the sperm plasma membrane [Rufo et al., 1982]. The metabolites taurine and phosphoric acid showed a higher area in the HP group than LP. Taurine is important as a capacitating agent and a sperm motility factor with antioxidative and membrane-stabilizing effects, this fact collaborates with our findings. Also, the taurine can improve motility of frozen-thawed sperm [Chhillar et al., 2012].

Ten metabolites showed at least one correlation in the Pearson analysis. Phosphoric acid showed negative correlation with sperm with high immobile spermatozoa and positive correlation with functional integrity, physical integrity, fertility, progressive motility, total motility, VCL, VSL, VAP, linearity, BCF, ALH, total volume of the ejaculate and total protein/ejaculated. The phosphoric acid contributes to the energy metabolism of the cell sperm which is produced by the breakdown of a pyrophosphate molecule inorganic (PPi). This process releases energy in the form of adenosine triphosphate (ATP), which can be used for sperm motility and acrosome function [Wallach et al., 1980; Lundin; Baltscheffsky, et al., 2012]. Phosphoric acid was identified in recent studies as

one of the most abundant metabolites in sperm and seminal plasma of bulls [Velho et al., 2018; Menezes et al., 2019].

1,3-dioxan-5-ol showed positive correlation with immobile spermatozoa and negative correlation with functional integrity, physical integrity, total motility, VCL, VSL, VAP, linearity, and BCF. 1,3-Dioxan-5-ol also called formal glycerol is a protected analog of glycerol and is often used in medicinal chemistry as a means to increase the lipophilicity of desired target molecules [Mousseau, 2013]. The embryotoxic and teratogenic potential of glycerol formal, a solvent used in pharmacological and toxicological experimentation, was investigated in gestation [Alivert et al., 1980]. The most abundant metabolites found in the seminal plasma of bulls with high or low fertility was 1,3-Dioxan-5-ol [Pessoa, 2021].

The tryptophan showed correlated negative with normal sperm and showed correlated positive sperm with major defects. Tryptophan is a versatile molecule as an aromatic amino acid. It has been proven that tryptophan can improve the motility rate and duration of sperm [Deng et al., 2020]. Fructose was the most predominant metabolite in seminal plasma of all bulls, is produced in the seminal vesicles, under androgen stimulation, and it has been found in seminal plasma of several species presented a correlation with circular motility, [Velho et al, 2018].

Lactic acid was negatively correlated with total protein for ejaculated. Lactic acid is used as another important energy source for sperm and lesser concentration of lactic acid has been detected in bull sperm with low viability [Velho et al, 2018]. Melatonin correlated with linearity and with protein concentration. Melatonin, an indolamine secreted by the pineal gland, is known as a powerful free-radical scavenger and wide-spectrum antioxidant [Kratz et al., 2016]. Carnitine showed a negative correlation with sperm with major defects. In humans total carnitine concentration was found to be low in the asthenospermia group when compared with the group of control. These findings suggest that the determination of seminal carnitine levels may be a useful test in evaluation of male infertility [Gürbüz, et al., 2003]. Phenylalanine presented a correlation with sperm with minor defects. In common carp the supplementations of phenylalanine decreased the spermatozoa velocity parameters and viability [Kanyilmaz et al., 2020].

Both metabolites Citric acid and Isoleucin showed a negative correlation with normal sperm and positive correlation with sperm with minor defects. There is controversial data in the literature, demonstrating that Citric Acid in seminal plasma is associated with bull fertility by potentially affecting sperm capacitation and acrosome reaction [Kumar et al., 2015]. Negative correlations have been found between sperm DNA fragmentation after freezing and the concentrations de isoleucine in bird [Santiago et al., 2020].

Metabolites are considered as the products of cell signaling pathways. For this reason, many studies in humans have already been conducted to determine the influence of the metabolites present in seminal plasma on sperm physiology, and to identify putative biomarkers [Otero et al., 2021].

There is mounting evidence that the constituents of seminal plasma are integral to the reproductive process, far more so than merely providing the fluid media for transport of spermatozoa through the male ducts [Salehi et al., 2013].

In our study, all proteins showed some relationship with the analyzed variables. Among all the proteins that stood out the most were Kallikrein-1E2 and Cysteine-rich secretory protein 3. These proteins are essential to the biological processes related to stallion fertility, providing insight into the proteins within seminal plasma. Four metabolites: oleic acid, isoleucine, taurine, and phosphoric acid, presented a difference ($P < 0.05$) between the HP and LP groups. The most relevant metabolites observed in Pearson's correlation of seminal plasma of stallions were phosphoric acid and 1,3-dioxan-5-ol. These metabolite can be used as a marker of reproductive physiology of the stallions. Although proteomics and metabolomics are currently being applied more in studies of human reproductive biology than in domestic animals, this approach offers a great opportunity to develop scientific solutions in order to increase the efficiency of animal production and its by-products.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

We are grateful to the Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) of the Universidade Federal de Viçosa (UFV), the Centro de Biotecnologia (CBiot) of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and the Analytical Center of the Institute of Chemistry laboratory 33 of the UFRGS for providing the facilities for the conduction of the experiments. The authors also acknowledge the financial support by the following Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) and Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI).

Table 1: Proteins identified in plasma seminal, using MALDI TOF/TOF, MASCOT algorithm and SCAFFOLD software.

Sample	Database	Protein								
		Accession_Number	Description	Mascot Score	SCAFFOLD Percentage	Coverage	Theoretical		Experimental	
							MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI
Spot_71	Equidae	CRISP3_HORSE	Cysteine-rich secretory protein 3	264	100,00%	33,80%	27,3	7.43	143,0	9.08
Spot_72	Equidae	A0A3Q2HBT8_HORSE	Seminal plasma protein HSP-1-like	165	100,00%	34,00%	17,5	6.53	16,0	3.63
Spot_78	Equidae	A0A3Q2H333_HORSE	Albumin	540	100,00%	27,00%	66,9	5.83	60,0	6.23
Spot_83	Equidae	A0A452GEN4_HORSE	Kallikrein-1E2	471	100,00%	29,10%	29,4	5.61	26,0	5.54
Spot_84	Equidae	A0A452GEN4_HORSE	Kallikrein-1E2	597	100,00%	21,80%	29,4	5.61	23,0	5.89
Spot_85	Equidae	A0A452GEN4_HORSE	Kallikrein-1E2	505	100,00%	29,10%	29,4	5.61	23,0	6.30
Spot_86	Equidae	A0A3Q2GSA0_HORSE	Carbohydrate-binding protein AQN-1	86	99,80%	11,93%	18,8	6.97	61,0	6.08
Spot_88	Equidae	A0A3Q2GSA0_HORSE	Carbohydrate-binding protein AQN-1	78	100,00%	15,34%	18,8	6.97	14,0	8.00
Spot_89	Equidae	A0A3Q2I8Y6_HORSE	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	70	100,00%	36,00%	38,2	5.24	36,0	4.67
Spot_89	Equidae	A0A3Q2L3I3_HORSE	Clusterin	46	100,00%	8,00%	50,8	5.76	36,0	4.67
Spot_90	Equidae	A0A3Q2I8Y6_HORSE	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	149	100,00%	40,00%	38,2	5.24	35,0	4.79
Spot_99	Equidae	A0A452GEN4_HORSE	Kallikrein-1E2	183	100,00%	12,26%	29,4	5.61	23,0	5.54
Spot_101	Equidae	A0A5F5Q2C7_HORSE	Cysteine-rich secretory protein 2	722	100,00%	29,69%	29,7	8.50	13,0	8.22
Spot_104	Equidae	A0A3Q2IHJ3_HORSE	Binder of sperm 2	276	100,00%	21,51%	18,5	7.96	13,0	8.43
Spot_107	Equidae	A0A3Q2H333_HORSE	Albumin	392	100,00%	23,65%	66,9	5.83	67,0	5.65
Spot_107	Equidae	F6W2K5_HORSE	Polymeric immunoglobulin receptor	166	100,00%	9,39%	93,1	6.02	67,0	5.65
Spot_123	Equidae	A0A3Q2H4E7_HORSE	Cathepsin L1	76	100,00%	12,18%	43,0	8.72	33,0	7.06
Spot_127	Equidae	F6SS14	Keratin	95	100,00%				137,0	4,96
Spot_128	Equidae	F6WDW3	Keratin	101	100,00%				137,0	5,00
Spot_131	Equidae	F6YIJ4_HORSE	Phospholipase A2	162	100,00%	24,37%	17,9	6.96	11,0	4.99
Spot_132	Equidae	A0A8C4L0V3_EQUAS	Ig-like domain-containing protein	148	100,00%	17,71%	28,0	5.09	10,0	4.24
Spot_133	Equidae	A0A452GEN4_HORSE	Kallikrein-1E2	631	100,00%	29,11%	29,4	5.61	25,0	5.21

Sample	Database	Protein								
		Acession_Number	Description	Mascot Score	SCAFFOLD Percentage	Coverage	Theoretical	Experimental		
							MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI
Spot_134	Equidae	A0A452GEN4_HORSE	Kallikrein-1E2	184	100,00%	11,49%	29,4	5.61	25,0	4.96
Spot_135	Equidae	A0A3Q2HBF6_HORSE	BPI fold-containing family A member 1	262	99,70%	21,93%	33,6	6.73	26,0	4.72

- a Spot ID correspond to the numbers shown in Fig. 2.
- b Protein abbreviation is in accordance with gene abbreviation in UniProt.
- c ; Mascot score corresponds to $10 \cdot \text{LOG}_{10}(P)$, where P is the absolute probability.
- d Probability for validation by Scaffold software of the proteins statistically identified by Mascot.
- e Protein coverage calculated by Scaffold (identified amino acids/total amino acids).
- f Number of peptides identified by Mascot and validated by Scaffold. The sequences of the peptides are found in S2 T

Table 2: BLAST of proteins from plasma seminal identified by MASCOT as “Uncharacterized protein”.

Table 2: BLAST of proteins from plasmaseminal identified by MASCOT as “Uncharacterized protein”.

<u>Sample</u>	<u>Database</u>	<u>Protein</u>								
		<u>Acession Number</u>	<u>Description</u>	<u>Mascot Score</u>	<u>SCAFFOLD Percentage</u>	<u>Coverage</u>	<u>Theoretical</u>		<u>Experimental</u>	
							<u>MW (kDa)</u>	<u>pI</u>	<u>MW (kDa)</u>	<u>pI</u>
Spot_77	<u>Equidae</u>	A0A3Q2I1A3_HORSE	<u>Uncharacterized protein</u>	149	99,90%	8,30%	25,8	8.51	8,0	8.61
Spot_100	<u>Equidae</u>	A0A3Q2I1A3_HORSE	<u>Uncharacterized protein</u>	197	99,80%	8,26%	25,8	8.51	9,0	8.19

- a Spot ID correspond to the numbers shown in Fig. 2.
- b Protein abbreviation is in accordance with gene abbreviation in UniProt.
- c MaxScore: the highest alignment score of a set of aligned segments.
- d Query coverage: the percent of the sequence query length that is included in the aligned segments.
- e E-Value: the number of alignments expected by chance (The lower the E value, the more significant the score and the alignment).

Table 3: Pearson's correlation coefficient between seminal parameters, pregnancy rate and the relative area of spots protein. Numbers in the table correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.

	71	72	77	78	83	84	85	86	88	89	90	99	100	101	104	107	123	127	128	131	132	133	134	135
Age	-,3195	-,5022	,0541	-,0006	,2683	,2678	,1050	-,1366	,7969	,0953	-,1841	,3932	-,1864	,7546	,1282	,4869	-,1288	,5749	,5322	,4455	,7923	,2715	,4166	,3632
	p=,246	p=,056	p=,848	p=,998	p=,334	p=,335	p=,710	p=,627	p=,000	p=,735	p=,511	p=,147	p=,506	p=,001	p=,649	p=,066	p=,647	p=,025	p=,041	p=,096	p=,000	p=,328	p=,122	p=,183
Sperm concentration	-,0216	,2739	,3041	-,1697	-,3598	-,5113	-,2243	-,4196	-,1627	-,3664	,3664	-,3999	-,3491	-,3721	,3398	-,2321	-,0363	-,4303	-,2448	-,6904	-,5319	-,3829	-,3601	,0946
	p=,939	p=,323	p=,271	p=,545	p=,188	p=,051	p=,422	p=,119	p=,562	p=,179	p=,179	p=,140	p=,202	p=,172	p=,215	p=,405	p=,898	p=,109	p=,379	p=,004	p=,041	p=,159	p=,187	p=,737
Functional integrity	-,4228	-,1576	,2256	-,0461	-,0407	-,0021	,0841	-,2374	,4209	-,0415	,0962	,0324	-,2677	,1711	,0379	,2438	,1050	-,0728	-,0615	-,2846	-,0855	,0627	,0999	,0943
	p=,116	p=,575	p=,419	p=,870	p=,886	p=,994	p=,766	p=,394	p=,118	p=,883	p=,733	p=,909	p=,335	p=,542	p=,893	p=,381	p=,710	p=,796	p=,828	p=,304	p=,762	p=,824	p=,723	p=,738
Physical integrity)	-,4655	,0526	,2729	-,3312	-,2108	-,2511	-,0598	-,4621	,3302	-,2257	,2452	-,1188	-,2651	,2928	,1055	,2261	,2491	-,0821	-,0849	-,1537	-,1162	-,1976	-,0003	,0940
	p=,080	p=,852	p=,325	p=,228	p=,451	p=,367	p=,832	p=,083	p=,229	p=,419	p=,378	p=,673	p=,340	p=,290	p=,708	p=,418	p=,371	p=,771	p=,763	p=,584	p=,680	p=,480	p=,999	p=,739
Normal sperm	-,1130	,1208	,2177	-,1178	-,2113	-,0816	-,1698	,2587	-,1413	-,0601	,0212	-,1136	,3468	,0296	-,3708	-,0838	,5156	,1176	-,0023	,2422	-,0770	-,2115	-,1315	-,2552
	p=,688	p=,668	p=,436	p=,676	p=,450	p=,773	p=,545	p=,352	p=,615	p=,832	p=,940	p=,687	p=,205	p=,917	p=,174	p=,766	p=,049	p=,676	p=,993	p=,384	p=,785	p=,449	p=,640	p=,359
Sperm with defects major	,1736	-,1495	-,5431	,6521	,7010	,4789	,1538	,2436	,2417	,2471	-,2787	,6680	,1511	-,1780	-,3342	,5036	-,2076	-,3534	-,2992	,0196	-,0479	,5048	,3205	-,2400
	p=,536	p=,595	p=,036	p=,008	p=,004	p=,071	p=,584	p=,382	p=,386	p=,375	p=,314	p=,006	p=,591	p=,526	p=,223	p=,056	p=,458	p=,196	p=,279	p=,945	p=,865	p=,055	p=,244	p=,389
Sperm with defects minor	,0017	-,0158	,1293	-,2903	-,2353	-,2200	,0636	-,4015	-,0201	-,0994	,1475	-,3076	-,4195	,0795	,5561	-,2354	-,3660	,1047	,1868	-,2459	,1024	-,1123	-,0778	,3919
	p=,995	p=,955	p=,646	p=,294	p=,399	p=,431	p=,822	p=,138	p=,943	p=,724	p=,600	p=,265	p=,120	p=,778	p=,031	p=,398	p=,180	p=,710	p=,505	p=,377	p=,717	p=,690	p=,783	p=,149
Fertility	-,6251	-,2955	,5288	,0987	-,0187	,1775	-,3359	,0538	,0431	-,1922	-,2511	,2357	,3617	,1724	-,3979	,2747	,4456	,2574	,1860	,3126	,1382	,1482	,2222	-,4708
	p=,013	p=,285	p=,043	p=,726	p=,947	p=,527	p=,221	p=,849	p=,879	p=,492	p=,367	p=,398	p=,185	p=,539	p=,142	p=,322	p=,096	p=,354	p=,507	p=,257	p=,623	p=,598	p=,426	p=,077
Total Motility	-,6071	-,1215	,3154	,0020	-,1140	-,1321	-,0942	-,4178	,2137	-,2097	,2074	,0423	,2413	,2455	,1130	,2956	,1583	-,1522	-,0855	-,0537	-,2310	-,0482	,2324	,0668
	p=,016	p=,666	p=,252	p=,994	p=,686	p=,639	p=,738	p=,121	p=,444	p=,453	p=,458	p=,881	p=,386	p=,378	p=,688	p=,285	p=,573	p=,588	p=,762	p=,849	p=,407	p=,865	p=,405	p=,813
Progressive Motility	-,2642	-,1564	,2236	,1071	-,0721	-,0022	-,1889	-,0355	,2404	-,0898	-,1636	,1373	,5708	,3923	-,1275	,2743	,3575	,0781	,0639	,4043	,1963	,0032	,2110	,0473
	p=,341	p=,578	p=,423	p=,704	p=,798	p=,994	p=,500	p=,900	p=,388	p=,750	p=,560	p=,626	p=,026	p=,148	p=,651	p=,323	p=,191	p=,782	p=,821	p=,135	p=,483	p=,991	p=,450	p=,867
Circular motility	-,1667	-,1863	,5313	,1161	-,0778	-,1848	-,2283	-,0732	,4036	-,1490	-,1631	,0215	-,0436	,2911	,2677	-,0120	,0740	,5152	,6594	,0322	,3785	-,2167	-,0939	,3681
	p=,553	p=,506	p=,042	p=,680	p=,783	p=,510	p=,413	p=,796	p=,136	p=,596	p=,561	p=,939	p=,877	p=,292	p=,335	p=,966	p=,793	p=,049	p=,007	p=,909	p=,164	p=,438	p=,739	p=,177
Fast Motility	,0128	-,0402	-,0765	,3423	,0032	,1002	-,0483	,2162	-,0852	,0579	,0748	,1068	,7686	,0150	-,0864	,0863	,0212	-,1324	-,1448	,3130	-,0591	,0910	,2113	,1147
	p=,964	p=,887	p=,786	p=,212	p=,991	p=,722	p=,864	p=,439	p=,763	p=,838	p=,791	p=,705	p=,001	p=,958	p=,760	p=,760	p=,940	p=,638	p=,607	p=,256	p=,834	p=,747	p=,450	p=,684

	71	72	77	78	83	84	85	86	88	89	90	99	100	101	104	107	123	127	128	131	132	133	134	135
Slow Motility	-,3207	-,1377	,2287	-,1706	-,0777	-,0430	-,1672	-,2136	,3031	-,1344	-,2596	,1030	,1807	,4714	-,1760	,3197	,4786	,0795	,0333	,3137	,2300	-,0190	,1494	-,1311
	p=,244	p=,625	p=,412	p=,543	p=,783	p=,879	p=,551	p=,445	p=,272	p=,633	p=,350	p=,715	p=,519	p=,076	p=,530	p=,245	p=,071	p=,778	p=,906	p=,255	p=,409	p=,946	p=,595	p=,641
Local Motility	-,5126	-,0035	,1890	-,0888	-,0765	-,1422	,0634	-,4587	,0407	-,1678	,4063	-,0781	-,2547	-,0785	,2428	,1033	-,1505	-,2435	-,1568	-,4551	-,4568	-,0476	,0793	,0374
	p=,051	p=,990	p=,500	p=,753	p=,786	p=,613	p=,822	p=,085	p=,886	p=,550	p=,133	p=,782	p=,360	p=,781	p=,383	p=,714	p=,592	p=,382	p=,577	p=,088	p=,087	p=,866	p=,779	p=,895
Immobile spermatozoa	,6148	,1323	-,2782	,0620	,1028	,1341	,0986	,4565	-,2469	,2154	-,2011	-,0660	-,2520	-,3393	-,1106	-,3556	-,2031	,1411	,0959	-,0515	,1722	,0481	-,2791	-,0535
	p=,015	p=,638	p=,315	p=,826	p=,716	p=,634	p=,727	p=,087	p=,375	p=,441	p=,472	p=,815	p=,365	p=,216	p=,695	p=,193	p=,468	p=,616	p=,734	p=,855	p=,539	p=,865	p=,314	p=,850
Curvilinear Velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$)	-,3025	-,0157	,2996	,2752	-,0221	-,0216	-,2085	-,0496	,2297	-,1494	,0689	,1656	,4532	,0730	-,1018	,3061	,3656	-,2184	-,1923	,0697	-,1718	-,0008	,1856	,0082
	p=,273	p=,956	p=,278	p=,321	p=,938	p=,939	p=,456	p=,861	p=,410	p=,595	p=,807	p=,555	p=,090	p=,796	p=,718	p=,267	p=,180	p=,434	p=,492	p=,805	p=,540	p=,998	p=,508	p=,977
Straight Line Velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$)	-,2920	-,1799	,3572	,3481	,0020	,0829	-,1891	,0709	,2268	-,0609	-,1292	,2033	,4955	,1138	-,0712	,2759	,3670	-,0647	-,0487	,1651	-,0050	,1126	,2444	-,0051
	p=,291	p=,521	p=,191	p=,204	p=,994	p=,769	p=,500	p=,802	p=,416	p=,829	p=,646	p=,467	p=,060	p=,686	p=,801	p=,320	p=,178	p=,819	p=,863	p=,557	p=,986	p=,689	p=,380	p=,986
Average Path Velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$)	-,2946	-,1181	,3481	,3413	-,0148	,0424	-,1896	,0458	,2080	-,0838	-,0532	,1762	,4901	,0730	-,0697	,2609	,3564	-,1163	-,0911	,1090	-,0861	,0666	,2105	,0093
	p=,287	p=,675	p=,204	p=,213	p=,958	p=,881	p=,499	p=,871	p=,457	p=,767	p=,851	p=,530	p=,064	p=,796	p=,805	p=,348	p=,192	p=,680	p=,747	p=,699	p=,760	p=,814	p=,451	p=,974
Linearity	,2078	-,3758	,0315	,0644	,1409	,2769	,1170	,4821	-,1406	,3206	-,5212	,0750	-,1154	-,0052	,0162	-,2133	,0561	,5031	,4344	,2605	,4147	,2274	,0382	-,2174
	p=,457	p=,168	p=,911	p=,820	p=,616	p=,318	p=,678	p=,069	p=,617	p=,244	p=,046	p=,791	p=,682	p=,985	p=,954	p=,445	p=,843	p=,056	p=,106	p=,348	p=,124	p=,415	p=,893	p=,436
Beat Cross Frequency (BCF, Hz)	-,4998	-,2640	,2051	-,0086	-,1133	-,0135	-,1011	-,2210	,1681	-,1380	,1062	,0801	,4791	,3604	-,0570	,2797	,1513	-,0184	-,0180	,2309	-,0036	,0429	,3069	,0146
	p=,058	p=,342	p=,463	p=,976	p=,688	p=,962	p=,720	p=,429	p=,549	p=,624	p=,706	p=,777	p=,071	p=,187	p=,840	p=,313	p=,590	p=,948	p=,949	p=,408	p=,990	p=,879	p=,266	p=,959
Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH, μm)	-,2737	,1422	,2712	,2028	-,0728	-,1081	-,2403	-,1099	,1689	-,2098	,1331	,0993	,4260	,0226	-,1492	,2730	,3997	-,3030	-,2770	,0114	-,2718	-,1013	,0848	-,0175
	p=,324	p=,613	p=,328	p=,468	p=,796	p=,701	p=,388	p=,697	p=,547	p=,453	p=,636	p=,725	p=,113	p=,936	p=,596	p=,325	p=,140	p=,272	p=,318	p=,968	p=,327	p=,720	p=,764	p=,951
Protein concentration mg/ml	-,0002	,0786	,3814	-,3073	-,4829	-,2836	-,3472	,0921	-,4710	-,2093	-,0628	-,4351	-,0025	-,2000	-,0659	-,4110	,2156	,1540	,1282	-,0354	-,0054	-,2798	-,3878	-,2635
	p=,999	p=,781	p=,161	p=,265	p=,068	p=,306	p=,205	p=,744	p=,076	p=,454	p=,824	p=,105	p=,993	p=,475	p=,816	p=,128	p=,440	p=,584	p=,649	p=,900	p=,985	p=,313	p=,153	p=,343
Total volume of the ejaculate	-,3062	,0217	,0810	-,1903	-,2156	-,0996	-,2965	-,1906	-,1244	-,5929	,4260	-,0236	,5591	,2068	-,2248	,1680	,0742	-,0912	-,1697	,3931	-,0344	-,1057	,1937	-,0860
	p=,267	p=,939	p=,774	p=,497	p=,440	p=,724	p=,283	p=,496	p=,659	p=,020	p=,113	p=,933	p=,030	p=,460	p=,421	p=,549	p=,793	p=,747	p=,545	p=,147	p=,903	p=,708	p=,489	p=,761

	71	72	77	78	83	84	85	86	88	89	90	99	100	101	104	107	123	127	128	131	132	133	134	135
Total Protein /Ejaculated	-,2445	,0451	,1835	-,2665	-,3538	-,1883	-,3752	-,1042	-,2912	-,4675	,3178	-,1845	,4310	,0651	-,2228	-,0103	,1313	-,0393	-,1121	,2866	-,0437	-,1836	-,0083	-,1985
	p=,380	p=,873	p=,513	p=,337	p=,196	p=,502	p=,168	p=,712	p=,292	p=,079	p=,248	p=,510	p=,109	p=,818	p=,425	p=,971	p=,641	p=,889	p=,691	p=,300	p=,877	p=,513	p=,977	p=,478

Table 4: Pearson's correlation coefficient between seminal parameters, pregnancy rate and the relative area of metabolites.

	Tryptophan	Fructose	Lactic acid	Ornithine	Melatonin	Acetyl carnitine	Carnitine	Phenylalanine	Isoleucine	Isovaleryl	Citric acid	Hippuric acid	1,3-dioxan-5-ol	Stearic acid	phosphoric acid	Oleic acid	Acid palmitic	Taurine
Age	,2009	,4210	,1345	,4622	-,2534	,0538	,3020	,2357	,2523	,4549	-,1009	-,0778	-,3294	,1739	,2733	,2018	,1442	,1453
	p=,473	p=,118	p=,633	p=,083	p=,362	p=,849	p=,274	p=,398	p=,364	p=,088	p=,721	p=,783	p=,231	p=,535	p=,324	p=,471	p=,608	p=,605
Sperm concentration	,4182	,1761	,0525	-,2658	,1836	,1710	,1688	,2898	,2764	-,3257	,4726	-,3754	-,1693	-,3319	,1138	,0719	,3700	,2078
	p=,121	p=,530	p=,853	p=,338	p=,513	p=,542	p=,548	p=,295	p=,319	p=,236	p=,075	p=,168	p=,546	p=,227	p=,686	p=,799	p=,175	p=,457
Functional integrity	,2754	,1242	-,3559	,2361	-,0560	,2984	,3431	,3099	,0472	,0976	,0366	,1085	-,6047	,0189	-,6162	,2905	,2850	,0593
	p=,321	p=,659	p=,193	p=,397	p=,843	p=,280	p=,211	p=,261	p=,867	p=,729	p=,897	p=,700	p=,017	p=,947	p=,014	p=,294	p=,303	p=,834
Physical integrity	,0611	-,0977	-,2820	,3400	-,2461	,0978	,3340	,0388	-,1879	-,0340	-,0280	-,0917	-,5714	-,2520	-,6306	,3179	,1736	-,0451
	p=,829	p=,729	p=,309	p=,215	p=,377	p=,729	p=,224	p=,891	p=,503	p=,904	p=,921	p=,745	p=,026	p=,365	p=,012	p=,248	p=,536	p=,873
Normal sperm	-,5524	-,3384	-,3545	-,2645	-,1115	-,2622	,0597	-,3951	-,7283	-,2441	-,6617	,1375	-,1566	-,0398	,3098	,0584	-,2239	-,3881
	p=,033	p=,217	p=,195	p=,341	p=,692	p=,345	p=,833	p=,145	p=,002	p=,381	p=,007	p=,625	p=,577	p=,888	p=,261	p=,836	p=,422	p=,153
Sperm with defects major	-,3175	-,1148	-,0930	,0084	-,2337	-,3266	-,7660	-,2527	-,0363	-,2825	-,1149	,0912	,3149	,0193	-,2858	-,1137	-,5980	-,2870
	p=,249	p=,684	p=,742	p=,976	p=,402	p=,235	p=,001	p=,363	p=,898	p=,308	p=,683	p=,747	p=,253	p=,946	p=,302	p=,687	p=,019	p=,300
Sperm with defects minor	,7250	,3929	,3933	,2443	,2500	,4470	,4102	,5332	,7161	,4066	,7020	-,1850	-,0451	,0208	-,1191	,0128	,5801	,5502
	p=,002	p=,147	p=,147	p=,380	p=,369	p=,095	p=,129	p=,041	p=,003	p=,133	p=,004	p=,509	p=,873	p=,941	p=,672	p=,964	p=,023	p=,034
Fertility	,0055	,0497	-,4223	-,1054	,2078	-,1553	,1926	-,0980	-,2105	,0728	-,1733	,0701	-,5102	,0092	-,6471	-,5637	,0608	,3248
	p=,984	p=,861	p=,117	p=,708	p=,457	p=,581	p=,492	p=,728	p=,452	p=,796	p=,537	p=,804	p=,052	p=,974	p=,009	p=,029	p=,830	p=,238
Total Motility	,2901	,1015	-,3623	,2129	-,2496	-,0616	,1904	,3039	-,0258	-,1823	,1545	,1790	-,6043	-,0916	-,7157	-,1075	,2624	,1956
	p=,294	p=,719	p=,184	p=,446	p=,370	p=,827	p=,497	p=,271	p=,927	p=,516	p=,582	p=,523	p=,017	p=,746	p=,003	p=,703	p=,345	p=,485

	Tryptophan	Fructose	Lactic acid	Ornithine	Melatonin	Acetyl carnitine	Carnitine	Phenylalanine	Isoleucine	Isovaleryl	Citric acid	Hippuric acid	1,3-dioxan-5-ol	Stearic acid	phosphoric acid	Oleic acid	Acid palmitic	Taurine
Progressive Motility	,0264	,2269	-,2749	-,0597	-,1402	-,3236	,1429	,3030	-,2127	-,0853	-,1418	,2369	-,4096	,0565	,5145	-,1460	-,0030	,1100
	p=,926	p=,416	p=,321	p=,833	p=,618	p=,239	p=,611	p=,272	p=,447	p=,762	p=,614	p=,395	p=,129	p=,841	p=,050	p=,604	p=,992	p=,696
Circular motility	,2241	,5804	,1243	,2018	-,1684	,1165	-,0602	,2653	,1809	-,1456	,1764	-,1205	-,1543	-,1043	,0751	,0382	,2290	,3286
	p=,422	p=,023	p=,659	p=,471	p=,549	p=,679	p=,831	p=,339	p=,519	p=,605	p=,529	p=,669	p=,583	p=,711	p=,790	p=,893	p=,412	p=,232
Fast Motility	,0199	,1013	-,3469	-,0444	-,0769	-,1723	-,0785	,3133	-,0684	-,1751	,0467	,3424	-,1911	,1250	,2437	-,2306	-,1066	,0891
	p=,944	p=,719	p=,205	p=,875	p=,785	p=,539	p=,781	p=,256	p=,809	p=,533	p=,869	p=,212	p=,495	p=,657	p=,381	p=,408	p=,705	p=,752
Slow Motility	-,0496	,0841	-,1066	-,1026	-,0966	-,3617	,2686	,0921	-,2966	,0610	-,2849	,0885	-,3461	,0103	,4763	-,0245	,0190	-,0107
	p=,861	p=,766	p=,705	p=,716	p=,732	p=,185	p=,333	p=,744	p=,283	p=,829	p=,303	p=,754	p=,206	p=,971	p=,073	p=,931	p=,947	p=,970
Local Motility	,3359	-,0916	-,2185	,3060	-,1507	,2538	,1268	,0864	,1721	-,1295	,3075	-,0270	-,3994	-,1727	,4259	,0087	,3234	,1374
	p=,221	p=,745	p=,434	p=,267	p=,592	p=,361	p=,652	p=,759	p=,540	p=,646	p=,265	p=,924	p=,140	p=,538	p=,113	p=,975	p=,240	p=,625
Immobile spermatozoa	-,2477	-,0612	,3546	-,3534	,2803	,0735	-,1914	-,2700	,0588	,1117	-,1805	-,2078	,5881	,0977	-,7206	,1084	-,2264	-,2133
	p=,373	p=,828	p=,195	p=,196	p=,312	p=,795	p=,494	p=,330	p=,835	p=,692	p=,520	p=,457	p=,021	p=,729	p=,002	p=,701	p=,417	p=,445
Curvilinear Velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$)	,0054	,1502	-,4475	-,1196	-,1924	-,2063	,0463	,2566	-,1942	-,4141	-,0273	,0369	-,5376	-,1065	,6034	-,0926	,0212	,0630
	p=,985	p=,593	p=,094	p=,671	p=,492	p=,461	p=,870	p=,356	p=,488	p=,125	p=,923	p=,896	p=,039	p=,706	p=,017	p=,743	p=,940	p=,823
Straight Line Velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$)	,1882	,3564	-,3548	-,1854	,0342	-,1130	,1675	,4543	,0009	-,2325	,1075	,0904	-,5252	,0667	,5491	-,2768	,1470	,2770
	p=,502	p=,192	p=,194	p=,508	p=,904	p=,688	p=,551	p=,089	p=,997	p=,404	p=,703	p=,749	p=,044	p=,813	p=,034	p=,318	p=,601	p=,318
Average Path Velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$)	,1371	,2886	-,4048	-,1441	-,0377	-,1107	,1086	,3981	-,0565	-,3091	,0887	,0931	-,5297	,0080	,5629	-,2207	,1119	,2185
	p=,626	p=,297	p=,135	p=,608	p=,894	p=,694	p=,700	p=,142	p=,841	p=,262	p=,753	p=,741	p=,042	p=,978	p=,029	p=,429	p=,691	p=,434
Linearity	,1042	,2581	,4331	-,1122	,5573	,2680	,1141	,0457	,2973	,4568	,1509	,1006	,4467	,4626	-,5273	-,3956	,1548	,2993
	p=,712	p=,353	p=,107	p=,690	p=,031	p=,334	p=,686	p=,871	p=,282	p=,087	p=,591	p=,721	p=,095	p=,083	p=,043	p=,144	p=,582	p=,279

	Tryptophan	Fructose	Lactic acid	Ornithine	Melatonin	Acetyl carnitine	Carnitine	Phenylalanine	Isoleucine	Isovaleryl	Citric acid	Hippuric acid	1,3-dioxan-5-ol	Stearic acid	phosphoric acid	Oleic acid	Acid palmitic	Taurine
Beat Cross Frequency (BCF, Hz)	,2674	,1594	-,3745	,0984	-,0975	-,1467	,3024	,3761	-,0657	,0822	-,0189	,3976	-,5416	,1433	,7055	-,1737	,2198	,2038
	p=,335	p=,570	p=,169	p=,727	p=,730	p=,602	p=,273	p=,167	p=,816	p=,771	p=,947	p=,142	p=,037	p=,610	p=,003	p=,536	p=,431	p=,466
Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH, μ m)	-,1475	-,0174	-,4942	-,1101	-,2993	-,2840	-,0553	,0858	-,3569	-,5294	-,1262	-,0105	-,5079	-,2504	,5945	,0017	-,1004	-,0775
	p=,600	p=,951	p=,061	p=,696	p=,278	p=,305	p=,845	p=,761	p=,192	p=,042	p=,654	p=,970	p=,053	p=,368	p=,019	p=,995	p=,722	p=,784
Protein concentration mg/ml	,1871	,0625	-,0471	-,3012	,6876	,1892	,3854	,0486	,0410	,2416	,1875	-,1414	-,0918	-,0780	,0895	-,3564	,1923	,3798
	p=,504	p=,825	p=,868	p=,275	p=,005	p=,500	p=,156	p=,863	p=,885	p=,386	p=,503	p=,615	p=,745	p=,782	p=,751	p=,192	p=,492	p=,163
Total volume of the ejaculate	-,0321	-,1940	-,5156	,3802	-,0885	-,1242	,1381	-,0317	-,2334	,1770	-,0006	,2682	-,3942	-,1071	,5941	-,1761	-,0439	,2104
	p=,910	p=,489	p=,049	p=,162	p=,754	p=,659	p=,624	p=,911	p=,402	p=,528	p=,998	p=,334	p=,146	p=,704	p=,020	p=,530	p=,877	p=,452
Total Protein/Ejaculated	,0345	-,1553	-,4523	,1709	,2277	-,0283	,2590	-,0286	-,1773	,2326	,0673	,1344	-,3587	-,1352	,5182	-,2898	,0028	,2951
	p=,903	p=,580	p=,091	p=,542	p=,414	p=,920	p=,351	p=,919	p=,527	p=,404	p=,812	p=,633	p=,189	p=,631	p=,048	p=,295	p=,992	p=,286

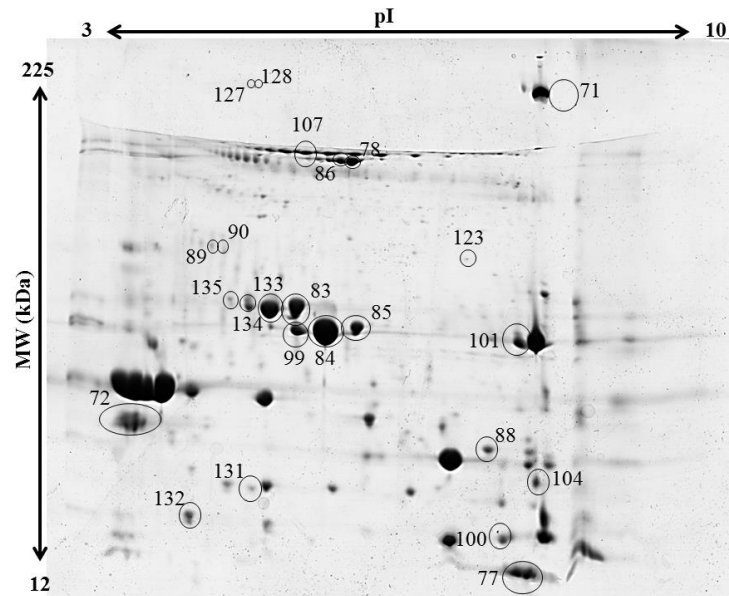


Fig. 4: Representative SDS-PAGE 2D with spots from the seminal plasma in stallion HP group. Numbers in the figure correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.

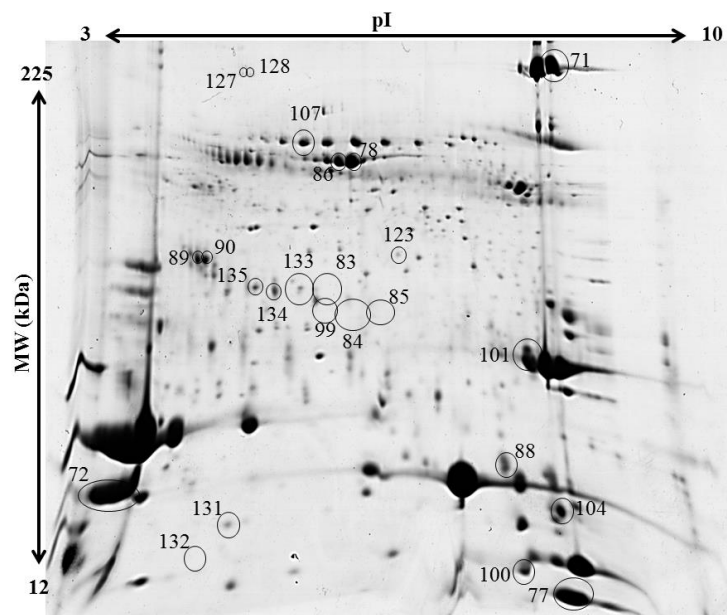


Fig. 5: Representative SDS-PAGE 2D with spots from the seminal plasma in stallion LP group. Numbers in the figure correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.

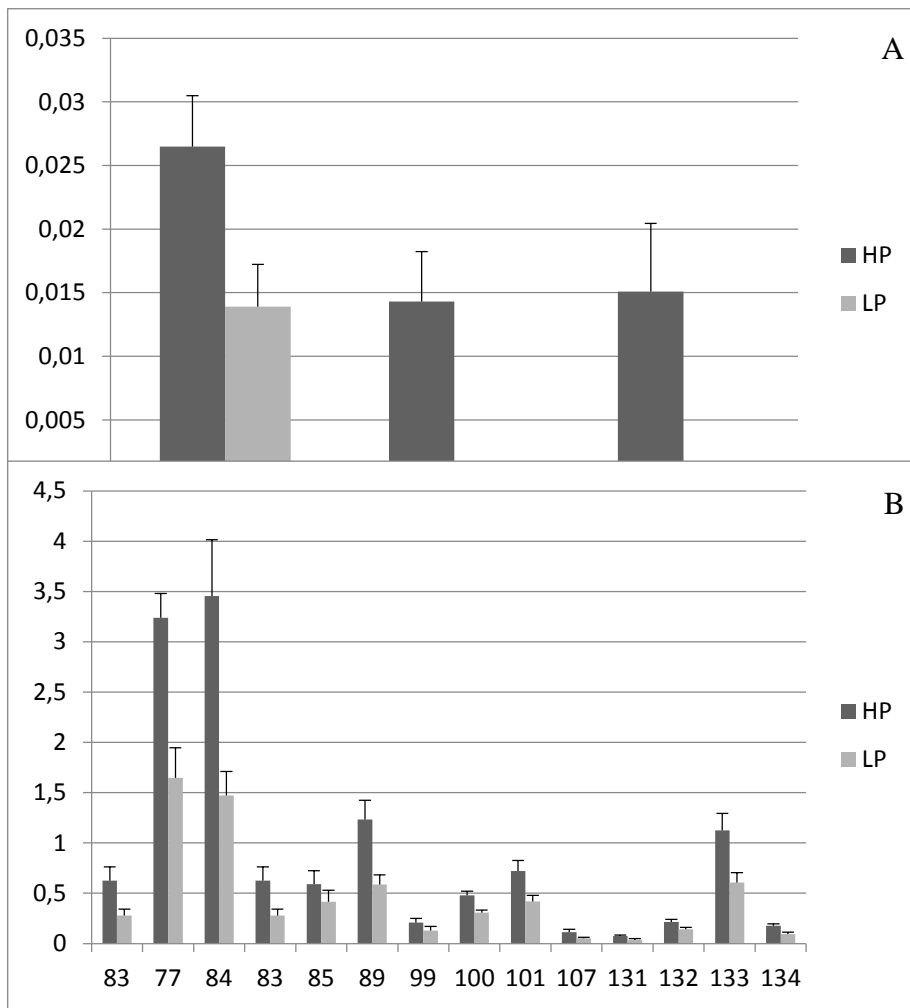


Fig. 6: Mean (\pm SEM) relative abundance (%) of proteins with higher abundance in the seminal plasma in stallion HP group with significant differences ($P < 0.05$) between groups. The letter A and B mean difference in magnitude on the scale. Numbers in the graphic correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.

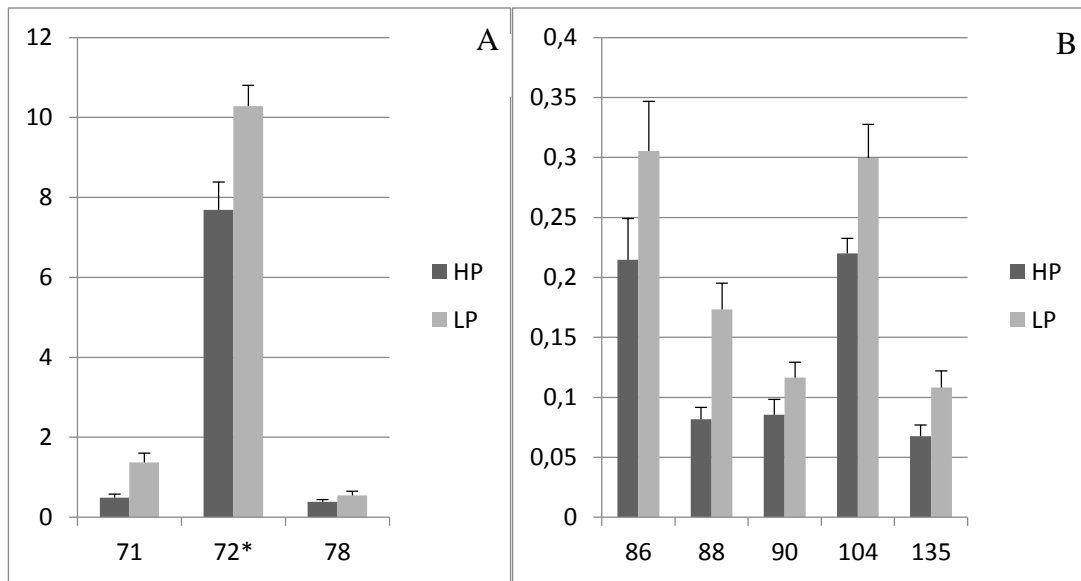


Fig. 7: Mean (\pm SEM) relative abundance (%) of proteins with higher abundance in the seminal plasma in stallion LP group with significant differences ($P < 0.05$) between groups. A pound mark (*) indicates indicates that the mean has a tendency to differ significantly. The letter A and B mean difference in magnitude on the scale. Numbers in the graphic correspond to the Spot ID shown in Tables 1 and 2.

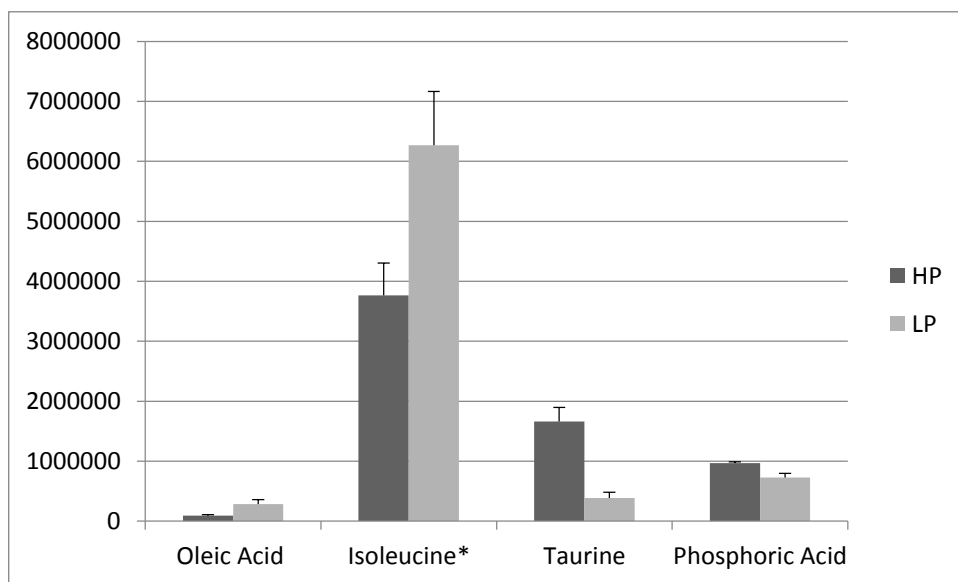


Fig. 8: Mean (\pm SEM) relative area (%) of metabolites with different abundances in the HP and LP group significant differences ($P < 0.05$) between groups. A pound mark (*) indicates indicates that the mean has a tendency to differ significantly.

5. References

Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E, Leone VG, Mariani L. Effects of glycerol formal on embryonic development in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 56:93–100. doi: 10.1016/0041-008x(80)90134-9.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403-410. doi:10.1006/jmbi.1990.9999.

Arroteia KF, Barbieri MF, Souza GH, Tanaka H, Eberlin MN, Hyslop S, Alvares LE, Pereira LA. Albumin is synthesized in epididymis and aggregates in a high molecular mass glycoprotein complex involved in sperm-egg fertilization. *PLoS One* 2014; 9: 103566. doi: 10.1371/journal.pone.0103566.

Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* 1981. 80: 535-561. doi: 10.1016/s0076-6879(81)80043-2.

Barrier Battut I, Kempfer A, Becker J, Lebailly L, Camugli S, Chevrier L. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology* 2016; 86:1111-1131. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.001.

Bastos HBA, Martinez MN, Camozzato GC, Estradé MJ, Barros E, Vital CE, Vidigal PMP, Meikle A, Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. *Theriogenology* 2019; 125: 224-235. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.11.002.

Binder NK, Sheedy JR, Hannan NJ, Gardner DK. Male obesity is associated with changed spermatozoa Cox4i1 mRNA level and altered seminal vesicle fluid composition in a mouse model. *Molecular Human Reproduction* 2015; 21: 424–434. doi:10.1093/molehr/gav010

Blom E. Ultrastrukturen af nogle karakteristiske sperimedefekter og forslag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermiogram [The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram. *Nord Vet Med* 1973; 25: 383-391.

Boe-Hansen GB, Rêgo JPA, Satake N, Venus B, Sadowski P, Nouwens A, Li Y, McGowan M. Effects of increased scrotal temperature on semen quality and seminal plasma proteins in Brahman bulls. *Mol Reprod Dev* 2020; 87: 574-597. doi: 10.1002/mrd.23328.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding or the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-254.

Castiglione Morelli MA, Ostuni A, Giangaspero B, Cecchini S, Carluccio A, Boni R. Relationships between Seminal Plasma Metabolites, Semen Characteristics and Sperm Kinetics in Donkey (*Equus asinus*). *Animals* 2021; 11: 201. doi: 10.3390/ani11010201

Chhillar S, Singh VK, Kumar R, Atreja SK. Effects of Taurine or Trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. *Anim Reprod Sci* 2012; 35: 1-7. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.08.029.

Colenbrander B, Gadella B, Stout T. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 2003; 38: 305–331. doi:10.1046/j.1439-0531.2003.00451.

Cunningham KA, Carey AJ, Finnie JM, Bao S, Coon C, Jones R, Wijburg O, Strugnell RA, Timms P, Beagley KW. Poly-immunoglobulin receptor-mediated transport of IgA into the male genital tract is important for clearance of *Chlamydia muridarum* infection. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60:405-14. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00637.x.

Deng M, Lin F, Zhou C, Chen Y, Xuan L, Wang H, Hu L. Determination of 27 amino acids' levels in seminal plasma of asthenospermia and oligospermia patients and diagnostic value analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2020; 184: 113211. doi:10.1016/j.jpba.2020.113211

Dietrich MA, Samczuk P, Ciborowski M, Nynca J, Parfieniuk E, Pietrowska K, Cierieszko, A. Metabolic fingerprinting of carp and rainbow trout seminal plasma. *Aquaculture* 2018; 501: 178-190, doi:10.1016/j.aquaculture.2018.11

Ekhlesi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoleva M, Petrunkina A, Töpfer-Petersen E. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod* 2005; 73: 536-545. doi: 10.1095/biolreprod.105.040824.

Ekhlesi-Hundrieser M. Spermadhesin AQN1 Is a Candidate Receptor Molecule Involved in the Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in the Pig. *Biology of Reproduction* 2005; 73: 536–545. doi:10.1095/biolreprod.105.040824

Escoffier J, Jemel I, Tanemoto A, Taketomi Y, Payre C, Coatrieux C, Sato H, Yamamoto K, Masuda S, Pernet-Gallay K, Pierre V, Hara S, Murakami M, De Waard M, Lambeau G, Arnoult C. Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:1415-1428. doi: 10.1172/JCI40494.

Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux J. Stallion Epididymal Fluid Proteome: Qualitative and Quantitative Characterization; Secretion and Dynamic Changes of Major Proteins¹. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 1790-1803. doi:10.1095/biolreprod62.6.1790

Gouletsou PG, Tsangaris GT, Katsarou EI, Bourganou MV, Barbagianni MS, Venianaki AP, Bouroutzika E, Anagnostopoulos AK, Fthenakis GC, Katsafadou AI. Proteomics Evaluation of Semen of Clinically Healthy Beagle-Breed Dogs. *Vet Sci* 2022; 15: 697. doi: 10.3390/vetsci9120697.

Gu LH, Coulombe PA. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 13-23. doi:10.1016/j.ceb.2006.12.007

Guasti PN, Souza FF, Scott C, Papa PM, Camargo LS, Schmith RA, Papa FO. Equine seminal plasma and sperm membrane: Functional proteomic assessment. *Theriogenology* 2020; 156: 70-81. doi:10.1016/j.theriogenology.2020

Gulaya NM, Margitich VM, Govseeva MN, Klimashevsky VM. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Archives of Andrology* 2001; 46: 169-175. doi: 10.1080/01485010151096405

Gürbüz B, Yalti S, Fiçicioğlu C, Zehi'r K. Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2003; 23: 653-656. doi: 10.1080/01443610310001604466

Hamamah S, Seguin F, Barthelemy C, Akoka S, Le Pape A, Lansac J, Royere D. ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 51-55. doi: 10.1530/jrf.0.0970051..

Hamann H, Jude R, Sieme H, Mertens U, Töpfer-Petersen E, Distl O, Leeb T. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim Genet* 2007; 38:259-64. doi: 10.1111/j.1365-2052.2007.01594.x.

Hamann H, Mertens U, Sieme H, Klug E, Distl O. Einfluss des Besamungsmanagement auf Fruchtbarkeitsmerkmale in der Population des Hannoverschen Warmbluts. *Züchtungskunde* 2005; 77: 194-205.

Intasqui P, Antoniassi MP, Camargo M, Nichi M, Carvalho VM, Cardozo KH, Zylbersztejn DS, Bertolla RP. Differences in the seminal plasma proteome are associated with oxidative stress levels in men with normal semen parameters. *Fertil Steril* 2015; 104:292-301. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.04.037

Jia B, Liang J, Lv C, Memon S, Fang Y, Wu G, Quan, G. The characteristics of proteome and metabolome associated with contrasting sperm motility in goat seminal plasma. *Scientific Reports* 2021; 11: 15562. doi:10.1038/s41598-021-95138-9 .

Jobim MI, Oberst ER, Salbego CG, Wald VB, Horn AP, Mattos RC. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology* 2005; 63: 2053-2062. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.10.002.

Jobim MI, Trein C, Zirkler H, Gregory RM, Sieme H, Mattos RC. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 2011; 76: 765-771. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.010.

Kanyilmaz M, İnanan BE. DNA damage, oxidative stress, decreased viability and motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa induced by tryptophan, phenylalanine and cysteine amino acids during short-term storage. *Turkish Journal of Zoology* 2020; 44: 281-290. doi: 10.3906/zoo-1910-34.

Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem* 2002; 74: 5383-5392. doi: 10.1021/ac025747h.

Khosrowbeygi A, Zarghami N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007; 77: 117-121. doi: 10.1016/j.plefa.2007.08.003.

Koh YQ, Peiris HN, Vaswani K, Almughlliq FB, Meier S, Burke CR, Roche JR, Reed CB, Arachchige BJ, Reed S, Mitchell MD. Proteome profiling of exosomes derived from plasma of heifers with divergent genetic merit for fertility. *J Dairy Sci* 2018; 101: 6462-6473. doi: 10.3168/jds.2017-14190.

Kratz EM, Piwowar A, Zeman M, Stebelová K, Thalhammer T. Decreased melatonin levels and increased levels of advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility. *Reprod Fertil Dev* 2016; 28: 507-515. doi: 10.1071/RD14165.

Kumar A, Kroetsch T, Blondin P, Anzar M.. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: ¹H nuclear magnetic resonance analysis. *Molecular Reproduction and Development* 2015; 82: 123–131. doi:10.1002/mrd.22450

Lagares MA. Preservação do sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arq Fac Vet UFRGS* 1998; 26: 29-42.

Larentis GR, Camozzato GC, Bastos HBA, Gregor RM, Mattos RC. Equine Sperm Selection by Synthetic Membrane Filter. *Journal of Equine Veterinary Science* 2018; 63: 69–73.

Lin C-Y, Hung P, VandeVoort CA, Miller MG. ¹H NMR to investigate metabolism and energy supply in rhesus macaque sperm. *Reproductive Toxicology* 2009; 28: 75–80. doi:10.1016/j.reprotox.2009.03.005.

Lundin M, Baltscheffsky H, Ronne H. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J Biol Chem* 1991; 266: 12168-12172.

Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH. Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biol Reprod* 1988; 38: 667-685. doi: 10.1095/biolreprod38.3.667.

Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002; 53:109-119. doi: 10.1016/s0165-0378(01)00098-5.

Marchler-Bauer A, Panchenko AR, Shoemaker BA, Thiessen PA, Geer LY, Bryant SH. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 281-283. doi: 10.1093/nar/30.1.281.

Martins JAM, Souza CEA, Silva FDA, Cadavid VG, Nogueira FC, Domont GB, Moura AA. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. *Small Ruminant Research* 2013; 113: 115-127. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.0

Mateo-Otero Y, Fernández-López P, Ribas-Maynou J, Roca J, Miró J, Yeste M, Barranco I. Metabolite Profiling of Pig Seminal Plasma Identifies Potential Biomarkers for Sperm Resilience to Liquid Preservation. *Front Cell Dev Biol* 2021; 28: 669974. doi: 10.3389/fcell.2021.669974.

Menezes EB, Velho ALC, Santos F, Dinh T, Kaya A, Topper E, Moura AA, Memili E. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. *BMC Genomics* 2019; 20:714. doi: 10.1186/s12864-019-6074-6.

Menezes TA, Bustamante-Filho IC, Paschoal AFL, Dalberto PF, Bizarro CV, Bernardi ML, Ulguim RDR, Bortolozzo FP, Mellagi APG. Differential seminal plasma proteome signatures of boars with high and low resistance to hypothermic semen preservation at 5°C. *Andrology* 2020; 8: 1907-1922. doi: 10.1111/andr.12869.

Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Dziekońska A, Gackowska K, Sobiewska M, Kuzborska A, Majewska AM, Filipowicz K, Kordan W. Identification of proteoforms of albumin and kallikrein in stallion seminal plasma and their correlations with sperm motility. *Pol J Vet Sci* 2019; 22: 227-235. doi: 10.24425/pjvs.2019.127090.

Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J Androl* 2006; 27: 534-541. doi: 10.2164/jandrol.05201.

Mousseau, J. J. 1,3-Dioxan-5-ol. Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis 213. doi:10.1002/047084289x.rn01563.

Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem 2003; 75: 4646-4658. doi: 10.1021/ac0341261.

Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem 2003; 75: 4646-4658. doi: 10.1021/ac0341261.

Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica 1999; 29:1181-1189. doi: 10.1080/004982599238047.

Panner Selvam MK, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Proteomics and metabolomics - Current and future perspectives in clinical andrology. Andrologia 2021; 53: 13711. doi: 10.1111/and.13711.

Pérez-Patiño C, Parrilla I, Barranco I, Vergara-Barberán M, Simó-Alfonso EF, Herrero-Martínez JM, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA, Roca J. New In-Depth Analytical Approach of the Porcine Seminal Plasma Proteome Reveals Potential Fertility Biomarkers. J Proteome Res 2018; 17: 1065-1076. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00728.

PESSOA, Eduardo Rodrigues. Perfil metabólico do plasma seminal de touros guzerá (*Bos taurus indicus*) com diferentes parâmetros de congelabilidade do sêmen 2021; 57 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará.

Plante G, Prud'homme B, Fan J, Lafleur M, Manjunath P. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell Tissue Res* 2016; 363:105-127. doi: 10.1007/s00441-015-2289-2.

Rego JP, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, Corbet NJ, Corbet DH, Burns BM, Boe-Hansen GB, McGowan MR. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim Reprod Sci* 2014; 48:1-17. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.04.016.

Rufo GA, Jr., Singh JP, Babcock DF, Lardy HA. Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma. *J Biol Chem* 1992; 257: 4627-4632. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)34770-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34770-7).

Salehi M, Akbari H, Heidari MH, Molouki A, Murulitharan K, Moeini H, Novin MG, Aabed F, Taheri H, Fadaei F, Mohsenzadeh M, Jafari M, Pirouzi A, Heidari R. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Mol Reprod Dev* 2013; 80: 718-724. doi: 10.1002/mrd.22202.

Santiago-Moreno J, Blesbois E. Functional Aspects of Seminal Plasma in Bird Reproduction. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 5664. doi: 10.3390/ijms21165664.

Schäffer AA, Wolf YI, Ponting CP, Koonin EV, Aravind L, Altschul SF. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. *Bioinformatics* 1999; 12: 1000-1011. doi: 10.1093/bioinformatics/15.12.1000.

Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Töpfer-Petersen E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1387: 206-216. doi: 10.1016/s0167-4838(98)00122-8.

Senra RL, Ramírez-López CJ, Magalhães-Júnior MJ, Neves JGDS, Barros E, Waddington B, Guimarães SEF, Guimarães JD, Baracat-Pereira MC. Kallikrein proteoforms and reproductive parameters in stallion are conditioned by climate. *Sci Rep* 2022; 12: 18690. doi: 10.1038/s41598-022-21350-w.

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 2006; 6: 2856-2860.

Slowinska M, Sallem H, Clench MR, Cierieszko A. Metabolomic analysis of white and yellow seminal plasma in turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Poult Sci* 2018; 97: 1059-1065. doi: 10.3382/ps/pex366.

Somlev B, Helili K, Karcheva V. Tissue kallikrein activity in seminal plasma of bovine ejaculates with different quality. *Theriogenology* 1996; 45: 471-475. doi: 10.1016/0093-691x(95)00383-j.

Suliman Y, Becker F, Wimmers K. Implication of transcriptome profiling of spermatozoa for stallion fertility. *Reprod Fertil Dev* 2018; 30: 1087-1098. doi: 10.1071/RD17188.

Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wynder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 2019; 47: 607-613. doi: 10.1093/nar/gky1131.

Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 2003; 4: 41. doi: 10.1186/1471-2105-4-41.

The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research* 2014; 43: 204-212. doi:10.1093/nar/gku989.

Tirpák F, Halo M Jr, Tokárová K, Binkowski LJ, Vašíček J, Svoradová A, Błaszczuk-Altman M, Kováčik A, Tvrda E, Chrenek P, Lukáč N, Massányi P. Composition of Stallion Seminal Plasma and Its Impact on Oxidative Stress Markers and Spermatozoa Quality. *Life (Basel)* 2021; 11: 1238. doi: 10.3390/life11111238.

Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci* 2005; 89: 159-170. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.018.

Van Tilburg MF, Rodrigues MA, Moreira RA, Moreno FB, Monteiro- Moreira AC, Candido MJ, et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. *Theriogenology* 2013; 79: 1247-1261. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.03.013.

Van Tilburg M, Sousa S, Lobo MDP, Monteiro-Azevedo ACOM, Azevedo RA, Araújo AA, Moura AA. Mapping the major proteome of reproductive fluids and sperm membranes of rams: From the cauda epididymis to ejaculation. *Theriogenology* 2021; 159: 98-107. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.10.003.

Varner DD, b Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Hartman DL, Bliss SB, Carroll BS, Eslick, MC. Semen processing for the subfertile stallion. *J Equine Vet Sci* 2008; 28: 677-85. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.012>
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.012>
12

Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 2008; 70: 448-462. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.023

Velho ALC, Menezes E, Dinh T, Kaya A, Topper E, Moura AA, Memili E. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *PLoS One* 2018; 13: 0195279. doi: 10.1371/journal.pone.0195279.

Vieira LA, Matás C, Torrecillas A, Saez F, Gadea J. Seminal plasma components from fertile stallions involved in the epididymal sperm freezability. *Andrology* 2021; 9: 728-743. doi: 10.1111/andr.12944.

Wallach D, Revel M. An interferon-induced cellular enzyme is incorporated into virions *Nature*; 1980: 287:68-70. doi: 10.1038/287068a0.

Waheed MM, Ghoneim IM, Alhaider AK. Seminal plasma and serum fertility biomarkers in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 2015; 83: 650-654. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.033.

Wang G, Wu Y, Zhou T, Guo Y, Zheng B, Wang J, Bi Y, Liu F, Zhou Z, Guo X, Sha J. Mapping of the N-linked glycoproteome of human spermatozoa. *J Proteome Res* 2013; 12: 5750-5759. doi: 10.1021/pr400753f.

Wijnant K, Van Meulebroek L, Pomian B, De Windt K, De Henauw S, Michels N, Vanhaecke L. Validated Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Hybrid High-Resolution Mass Spectrometry and Laser-Assisted Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry for Salivary Metabolomics. *Anal Chem* 2020; 92: 5116-5124. doi: 10.1021/acs.analchem.9b05598.

Xibo Liu, Zhenjun Li, Weiting Ge et al. High expression of AZGP1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer: a retrospective study. *Research Square* 2013; <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1924314/v1>

Zhang Y, Liang H, Liu Y, Zhao M, Xu Q, Liu Z, Weng X. Metabolomic Analysis and Identification of Sperm Freezability-Related Metabolites in Boar Seminal Plasma. *Animals (Basel)* 2021; 11: 1939. doi: 10.3390/ani11071939.

Zhu C, Jin L, Luo B, Zhou Q, Dong L, Li X, Zhang H, Huang Y, Li C, Zou L, Laghi L. Dominant Components of the Giant Panda Seminal Plasma Metabolome, Characterized by ¹H-NMR Spectroscopy. *Animals (Basel)* 2022; 12: 1536. doi: 10.3390/ani12121536.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos criadores de cavalos almejarem animais geneticamente superiores, com melhores índices reprodutivos, há um distanciamento entre pesquisa e aplicação prática que impede a realização de programas consistentes e contínuos de seleção. A proteômica e a metabolômica podem ser uma ferramenta essencial para entender e prever a fertilidade masculina, diagnosticar precocemente distúrbios reprodutivos masculinos em animais e humanos. Estudar proteínas e metabólitos em SP pode nos ajudar a obter informações sobre a causa de certos casos inexplicáveis de infertilidade masculina. Pensando nisso, poderemos identificar biomarcadores que possam auxiliar na identificação desses indivíduos, possibilitando um manejo mais específico e o desenvolvimento de um produto que auxilie na melhora da fertilidade dos garanhões.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCCC. Associação Brasileira de Criadores de Cavalo. Disponível em: http://cavalocrioulo.org.br/studbook/cavalo_crioulo> Acesso em fevereiro de 2023.

AL-ESSAWE, M. E.; WALLGREN, M.; MANUELA WULF, AURICH, C.; MACÍAS-GARCÍA, B.; SJUNNESSON, Y.; MORRELL, J. M. Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. **Theriogenology**, v.115, p. 99-107, 2018.

AMANN R. P.; HAMMERSTEDT R. H. Detection of differences in fertility. **Journal of Andrology**, v.23, p.17-25, 2002.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKinnon, A. O.; Voss, J. L. **Equine Reproduction**, 6. ed. Iowa: Blackwell, p. 715-745, 1993.

AMANN, R.P. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. **Theriogenology**, v.63, p.698-715, 2005.

BELARDIN, L. B.; ANTONIASSI, M. P.; CAMARGO, M.; INTASQUI, P.; FRAIETTA, R.; BERTOLLA, R. P. Semen levels of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) protein families members in men with high and low sperm DNA fragmentation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 903, 2019.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N.; VANDERBOOM, R. J.; AX, R. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 1, p. 173- 182, 1996.

BIANCHI, E.; BOEKELHEIDE, K.; SIGMAN, M.; BRAUN, J.M.; ELIOT, M.; HALL, S.J.; et al. Spermatozoal large RNA content is associated with semen characteristics, sociodemographic and lifestyle factors. **PLoS ONE**, v. 14, p.1-13, 2019.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 863-73, 1999.

BREWIS, I.A.; GADELLA, B.M. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. **Molecular Human Reproduction**, v.16, p. 68-79, 2010.

BRITO LFC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007.

BROSNAHAN, M.M.; BROOKS, S.A.; ANTCZAK, D.F. Equine clinical genomics: A clinician's primer. **Equine Veterinary Journal**, v.42, p.658-670, 2010.

CARDOZO, J. A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑOBLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 841-850, 2006.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.

CHOWDHAR, Y. B. P.; PARIA, N.; RAUDSEPP, T. Potential applications of equine genomics in dissecting diseases and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.208-218, 2008.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**, Química Nova, v. 31, n. 3, p. 623–636., 2008.

COSTA, V.; ANGELINI, C.; DE FEIS, I.; CICCODICOLA, A. Uncovering the Complexity of Transcriptomes with RNA-Seq. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-9, 2010.

CUNHA, A. T. M. **Características estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos recuperados do epidídimo**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Animais), Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, p- 55 , 2015.

DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, p. 27-42, 2014.

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

DE VOS, R. C. H.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J. B.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, p. 778-791, 2007.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10149-10155, 1992.

DOBRAKOWSKI, M.; KASPERCZYK, S.; HORAK, S.; CHYRA-JACH, D.; BIRKNER, E.; KASPERCZYK, A. Oxidative stress and motility impairment in the semen of fertile males. **Andrologia**, v. 49, p.1-8, 2017.

DUDLEY, E.; YOUSEF, M.; WANG, Y.; GRIFFITHS, W. J. **Targeted metabolomics and mass spectrometry**, Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Amsterdam, v. 80, p. 45 - 83, 2010.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D. I.; ATHERTON, H. J.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p.387-426. 2011.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. **Metabolomics: current analytical platforms and methodologies**, Trends in Analytical Chemistry, Amsterdam, v. 24, p. 285-294, 2005.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER, P.; TÖPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, n. 1, p. 45-57, 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization – **FAO United Nations** (2016). Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>>. Acesso: dezembro 2021.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300-318, 2005.

GAMBOA, S. **Infertilidade Equina: Múltiplas Fragilidades Ou Um “Fado” Do Espermatozóide**. Teses de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. p. 267, 2011.

GARBAN, Z.; GABRIELA, G.; GHIBU, G.D. Biomarkers: Theoretical Aspects and Applicative Peculiarities. Note II. Nutritional Biomarkers. J. Agroaliment. **Processes Technology**, v.12, p.349-356, 2006.

GATTI, J. L.; CASTELA, S. DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 321-339, 2004.

GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, n. 32, p. 147-156, 2015.

GIANLUPPI, L. D. F.; BORTOLI, E. C.; SCHVARZ, R.; FALCÃO, B. T. F. & SILVA, T. N. Agregação de valor em equinos da raça crioula: um estudo de caso. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p.223, 2009.

GINTHER O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**, 2 ed. Equiservices: Madison, Wisconsin. v. 2, p. 642, 1992.

GOUVEIA, J. J. S.; REGITANO, L.C.A. EXTRAÇÃO DE DNA. IN: REGITANO, L. C. A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. S. **Protocolos em biologia molecular aplicada à produção animal**, São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, v.1, p.3-8, 2007.

GUASTI, P. N.; SOUZA, F. F.; SCOTT, C.; PAPA, P. M.; CAMARGO, L. S.; SCHMITH, R. A. et al. Equine seminal plasma and sperm membrane: Functional proteomic assessment. **Theriogenology**, v.156, p. 70-81, 2020.

GUPTA, A.; MAHDI, A. A.; AHMAD, M. K.; SHUKLA, K. K.; JAISWER, S. P.; SHANKHWAR, S. N. ¹H NMR spectroscopic studies on human seminal plasma: A probative discriminant function analysis classification model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 106-113, 2011.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, Monole. 7 ed, p.513, 2004.

HAMAMAH, S.; SEGUIN, F.; BARTHELEMY, C.; AKOKA, S.; LE, PAPE.; A., LANSAC, J.; ROYERE, D. ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p.51-55, 1993.

HARALD, S.; OTTMAR. D.; Genomics and fertility in stallions. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 32, p.467-470, 2012.

HERRLER, A.; BEIER, H.M. Early Embryonic Coats: Morphology, Function, Practical Applications. **Cells Tissues Organs**, v.166, p.233-246, 2000.

HINRICHS, K. Assisted reproduction techniques in the horse. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, p.80–93, 2013.

HOSKEN, D. J., & HODGSON, D. J. (2014). Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, n. 8, 451- 455, 2014.

ING, N.H.; FORREST, D.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D. Dense spermatozoa in stallion ejaculates contain lower concentrations of mRNAs encoding the sperm specific calcium channel 1, ornithine decarboxylase antizyme 3, aromatase, and estrogen receptor alpha than less dense spermatozoa. **Theriogenology**, v.82, p. 347-353, 2014.

JAYARAMAN, V.; GHOSH, S.; SENGUPTA, A.; SRIVASTAVA, S.; SONAWAT, H. M.; NARAYAN, P. K. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 3, p. 1195–1204, 2014.

JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Proteinase Inhibitors in Aggregated Forms of Boar Seminal Plasma Proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32. p. 99-107, 2003.

JOBIM, M. I. M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R. M.; SIEME, H.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 76, p. 765–771, 2011.

JONES, K.T.; CRUTTWELL, C.; PARRINGTON, J.; SWANN, K. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates. **FEBS Letters**, v.437, p.297, 1998.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 249-256, 2008.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.

KLINE, D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 50, p.125-54, 2000.

KOEHLER, J.K.; NUDELMAN E. D.; HAKOMORI, S. A collagen-binding protein on the surface of ejaculated rabbit spermatozoa. **Journal of Biological Chemistry**, p. 86:529–536, 1980.

KOISTINEN, H.; KOISTINEN, R.; HYDEN-GRANSKOG, C.; MAGNUS, O.; SEPPÄLÄ, M. Seminal plasma glycodefin and fertilization in vitro. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 5, p. 636-640, 2000.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B.; PEKNICOVÁ, J. JONÁKOVÁ, V. "Characterization of Human Seminal Plasma Proteins Homologous to Boar AQN Spermadhesins". **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, p. 33-46, 2005.

KUROKAWA M, SATO K-I, WU H, HE C, MALCUIT C, BLACK SJ, FUKAMI K, FISSORE RA. Functional, biochemical, and chromatographic characterization of the complete [Ca²⁺]_i oscillation-inducing activity of porcine sperm. **Developmental Biology**, v. 285, p. 376-392, 2005.

LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; MARTIN, G.; LEVY, R.; CHOCAT, A.; CARREAU, S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p.535-541, 2004.

LENZ, R. W.; AX, R. L.; GRIMEK, H. J.; FIRSTN, I. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 106, n. 4, p. 1092-1098, 1982.

LENZ, R. W.; BALL, G. D.; LOOHSE, J. K.; FIRST, N. L; AX, R. L Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 683-685, 1983.

LEON, P.M.M.; CAMPOS, V.P.; KAEFER, C.; BEGNIN, K. R.; MCBRIDE, J.A.; DELLAGOSTIN, O. A.; SEIXAS, K.; DESCHAMPS, J. C.; COLLARES, T. Expression of apoptotic genes in immature and in vitro matured equine oocytes and cumulus cells. **Zygote**, p. 1-7, 2011.

LIN, S.; YANG, Z.; SHEN, Y.; CAI, Z. LC/MS-based non-targeted metabolomics for the investigation of general toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 301, p. 29 -36, 2011.

MANN, T.; LUTWAKK-MANN, C. **General features of the seminal plasma**, In: Male reproductive and semen. 2 ed. Berlin: Springer-Verlang. p.28-34, 1981.

MAPA. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. p.7, 2017.

MEYERS, S. A. **Sperm physiology**, In: Samper, J. C. Equine breeding management and artificial insemination, 2. ed. Missouri: Saunders ELSEVIER, p. 47-55, 2009.

MILARDI, D.; GRANDE, G.; VINCENZONI, F.; CASTAGNOLA, M.; MARANA, R. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. **Molecular Reproduction and Development**, v.80, p.350–357, 2013.

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

MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; MARTINS, J. A. M.; OLIVEIRA, R. V.; MENEZES, E. B. S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p.139-144, 2011.

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

MOURA, A. A.; MEMILI, E.; RODRIGUES PORTELA, A. M.; VIANA, A. G.; CAZAUX VELHO, A. L. BARBOSA BEZERRA, M. J.; VASCONSELOS, F. R. Seminal plasma proteins and metabolites: effects on sperm function and potential as fertility markers. **Animal Reproduction**, v.15, p.691-702. 2018.

Muñoz, M.; Uyar, A.; Correia, E.; Díez, C.; Fernandez-Gonzalez, A.; Caamaño, JN. et al. Non-invasive assessment of embryonic sex in cattle by metabolic fingerprinting of in vitro culture medium. **Metabolomics**, v.10, p.443–51, 2014.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. Metabonomics: Understanding the metabolic responses of living systems to patho-physiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, p. 1181–1189. 1999.

Niederberger, C. (2005). Carnitines and Male Infertility. **The Journal of Urology**, v. 174, n. 4, p. 1369, 2005.

NORTHEAST. Disponível em: <<https://www.nebiolab.com/complete-guide-on-liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/>>. Acesso em: 16 dez. de 2022.

NOVAK, S.; SMITH, T. A.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M. K.; FOXCROFT, G. R.; DIXON, W. TBiomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**, v. 74, p. 956-967. 2010.

PAIVA, C.; AMARAL, A.; RODRIGUEZ, M.; CANYELLAS, N.; CORREIG, X.; BALLESCA, J. L.; RAMALHO-SANTOS, J.; OLIVA, R. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance ((¹H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Andrology**, v. 3, n. 3, p. 496-505, 2015.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 6788, p. 837–846, 2000.

PAPA, F. O. **Reprodução de garanhões**. 1. ed. São Paulo: MedVet, p. 22, 2020.

RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O.; CASTRO-CHAVES, M.M.; ALVARENGA, M.A. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v. 79, p. 1120-1123, 2013.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. **Animal Reproduction**. v.10, p.148-159, 2013.

ROMERO, A.; ROMÃO, M. J.; VARELA, P. F.; KOLLN, I.; DIAS, J. M.; CARVALHO, A. L.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 4, n. 10, p. 783-788, 1997.

SAUNDERS, C.M.; LARMAN, M.G.; PARRINGTON, J.; COX, L.J.; ROYSE, J.; BLAYNEY, L.M.; SWANN, K. e LAI, F.A. PLCz: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. **Development**, v. 129, p. 3533– 3544, 2002.

SYLVIA, J.; BEDFORD, G.; LORI, A.; MC, P.; DICKSON, D. e VARNER, M.; S. Characterization of Equine Phospholipase C Zeta: A Review and Preliminary Results on Expression Defects in Subfertile Stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.445-450, 2012.

SILVA, P..F..N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958–978, 2006.

SIMINTIRAS, C. A.; FORDE, N. Understanding the uterine environment in early pregnancy in cattle: How have the omics enhanced our knowledge? **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.538-546, 2017.

SULIMAN, Y.; BECKER. F.; WIMMERS, K;. Implication of transcriptome profiling of spermatozoa for stallion fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, p. 1087-1098, 2018.

TEIXEIRA, A. L. **Cavalo Crioulo – O símbolo do Rio Grande do Sul**. Editora: Viver no Campo. 2 ed., 2011.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid- binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 3, p. 590-598, 1999.

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

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal plasma proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 159-170, 2005.

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

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.S.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.171-186, 2005.

VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T. L.; HARTMAN DL, BLISS SB, CARROLL BS, ESLICK MC. Semen Processing for the Subfertile Stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, p.677-685, 2008.

VELHO, A. L. C.; MENEZES, E.; DINH, T.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A. A.; MEMILI, E. **Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma**, PLOS ONE, v. 4, 2018.

VILLAVERDE, A. I. **Localização Da Proteína Fosfolipase C Zeta Em Extratos Espermáticos De Gatos Domésticos Normospérmicos e Teratospérmicos**, Dissertação de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. p. 115, 2010.

Vital, R. J.; Mattos, L. A. de.; Souza, L. R. M. F. de.; Figueirêdo, S. da S.; Szejnfeld, J. Aspectos ultra-sonográficos das alterações não-neoplásicas do testículo. **Radiologia Brasileira**, v. 40, n. 1, p. 61–67, 2007.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDERM, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Review Genetic**, v.10,p. 57-63, 2009.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. **The physiology of reproduction**, 2 ed, Raven Press: p. 79-122, 1994.

XU, Y.; LU, H.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; WU, Q. Comprehensive metabolic profiles of seminal plasma with different forms of male infertility and their correlation with sperm parameters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 177, p. 1-9, 2020.

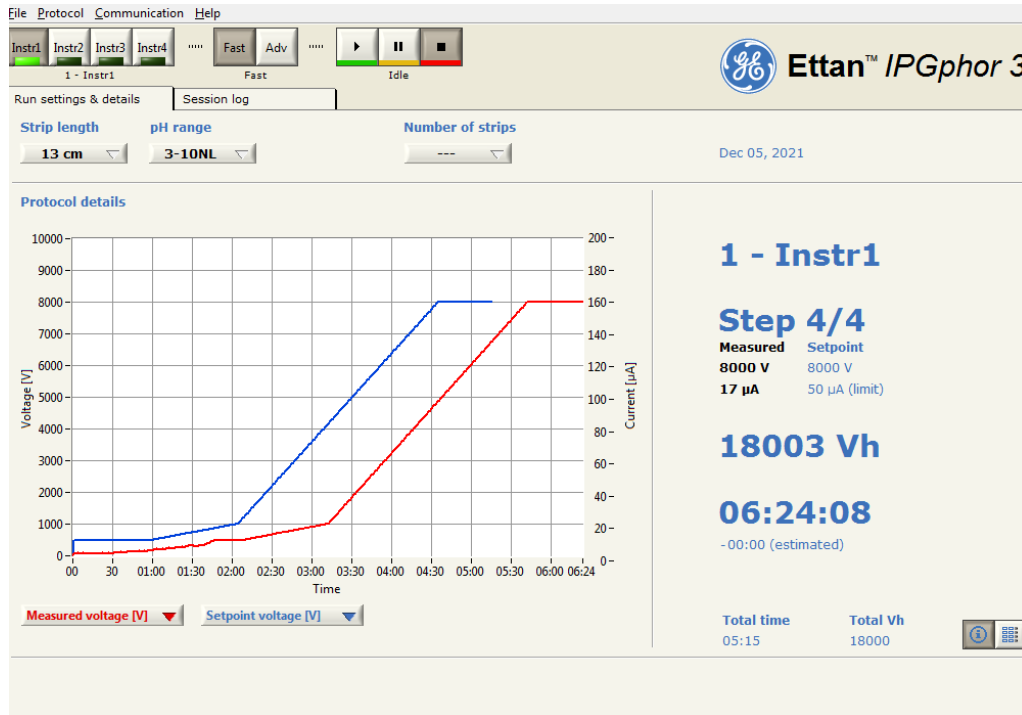
YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILLS, J. **The physiology of reproduction**, 2 ed. New York: Raven Press, p.189-317, 1994.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P; HAN, Y.; WANG, X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1079–1088, 2012.

ZHOU, X.; WANG, Y.; YUN, Y.; XIA, Z.; LU, H.; LUO, J.; LIANG, Y. A potential tool for diagnosis of male infertility: Plasma metabolomics based on GC-MS. **Talanta**, v. 147, p. 82-9, 2016.

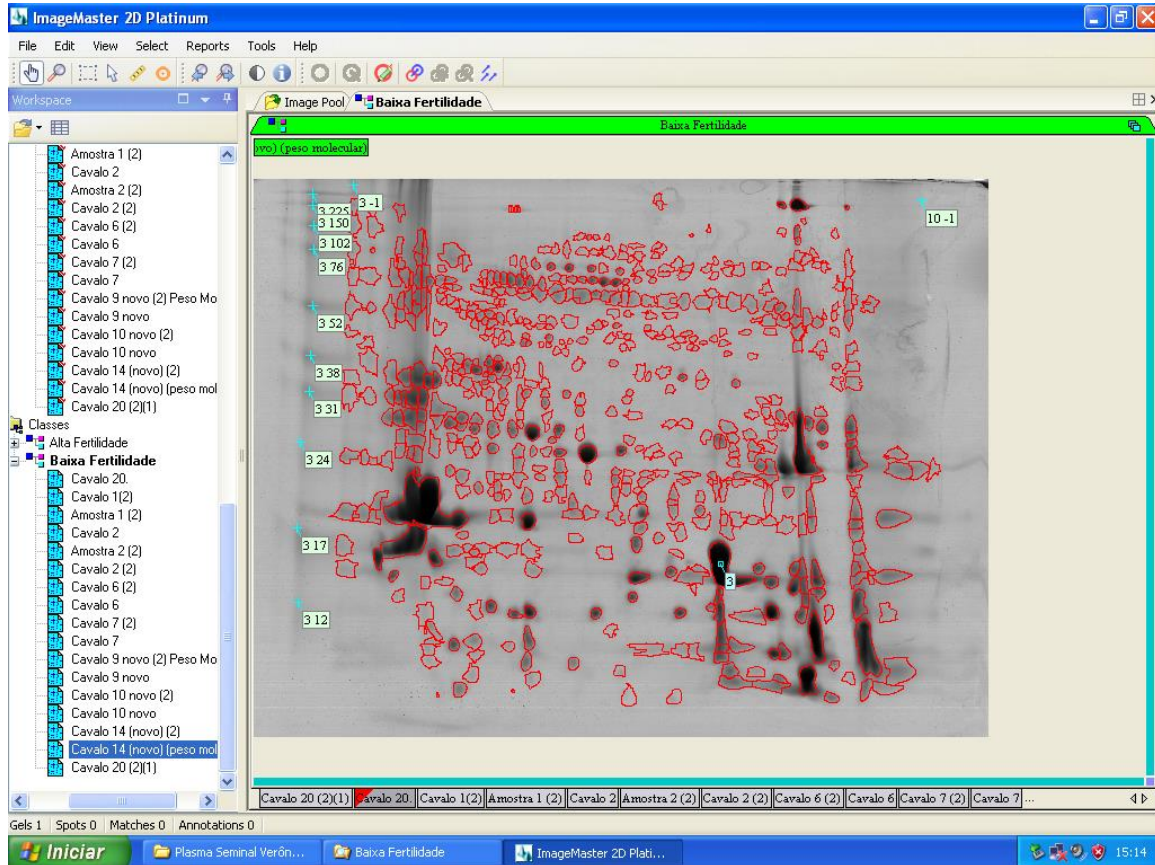
APÊNDICE A

Imagem representativa da Isoeletrofocalização baseada na migração de uma partícula carregada sob influência de um campo elétrico pelo software Ettan IPGphor3.



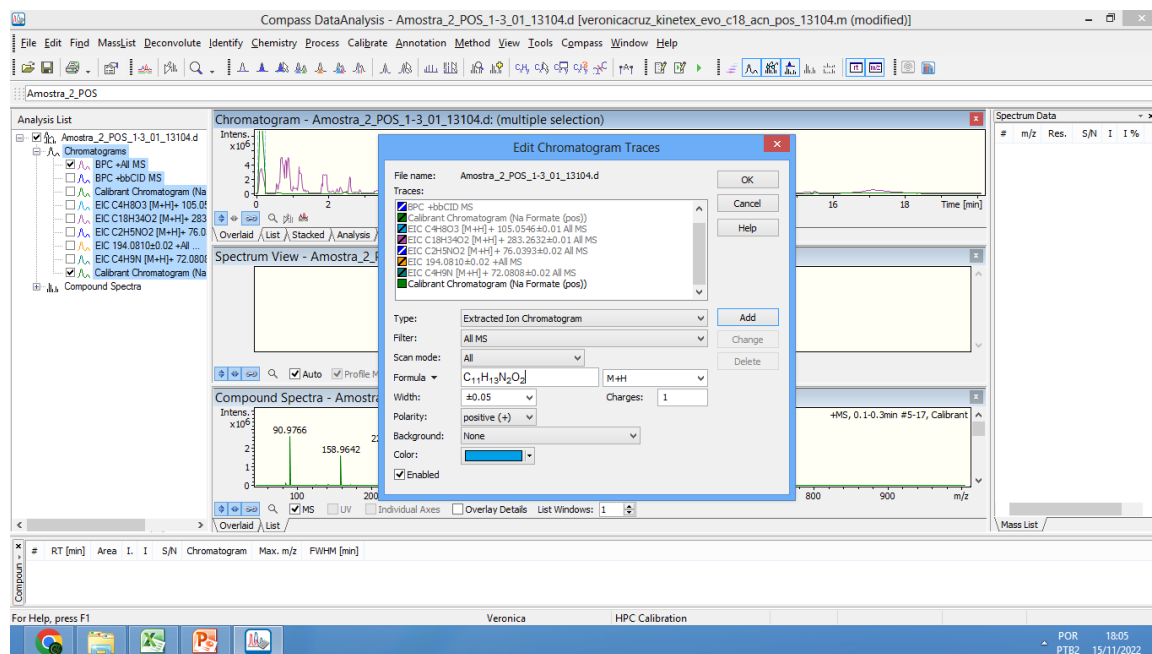
APÊNDICE B

Imagem representativa da análise do gel de eletroforese bidimensional pelo software ImageMaster™ 2D Platinum.



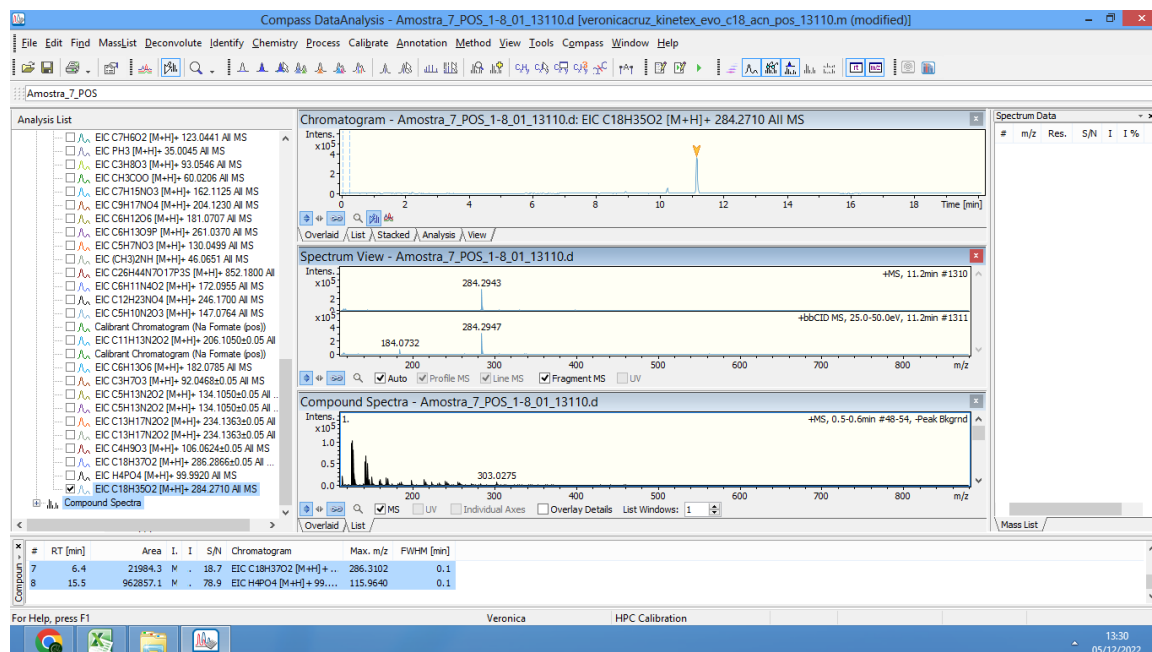
APÊNDICE C

Imagem representativa da identificação dos metabólitos alvos análise pelo Compass DataAnalysis.



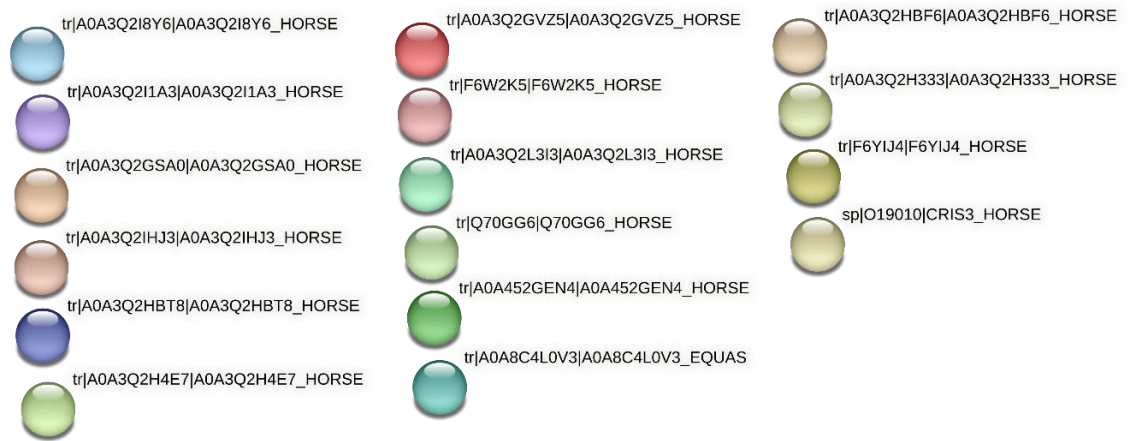
APÊNDICE D

Imagem representativa da quantificação de área do metabólito pelo Compass DataAnalysis.



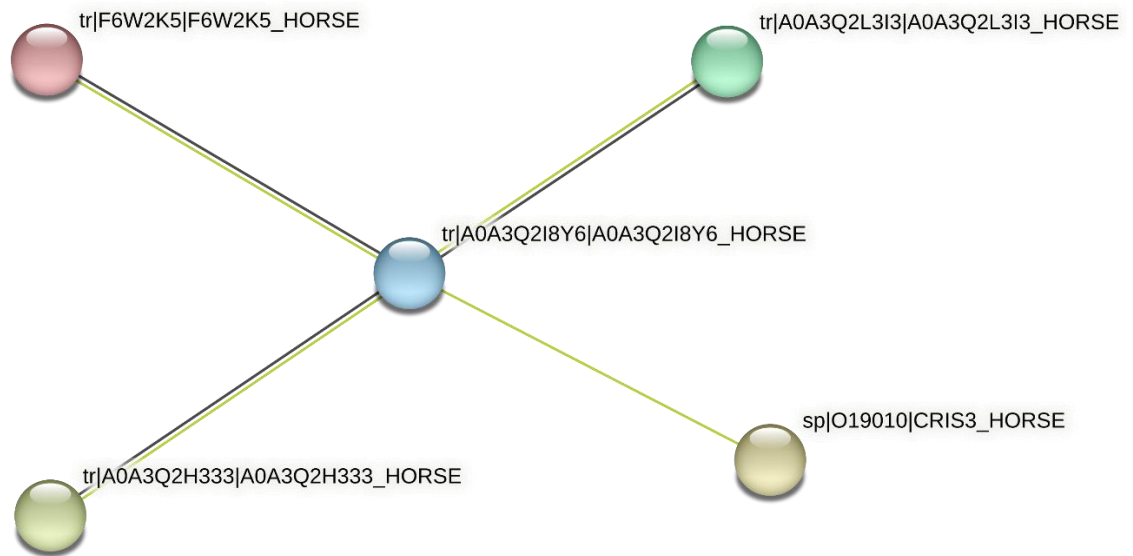
APÊNDICE E

Interação entre as proteínas identificadas e validadas estatisticamente, adotando escore 0,900 obtidas pelo aplicativo STRING 11.5.



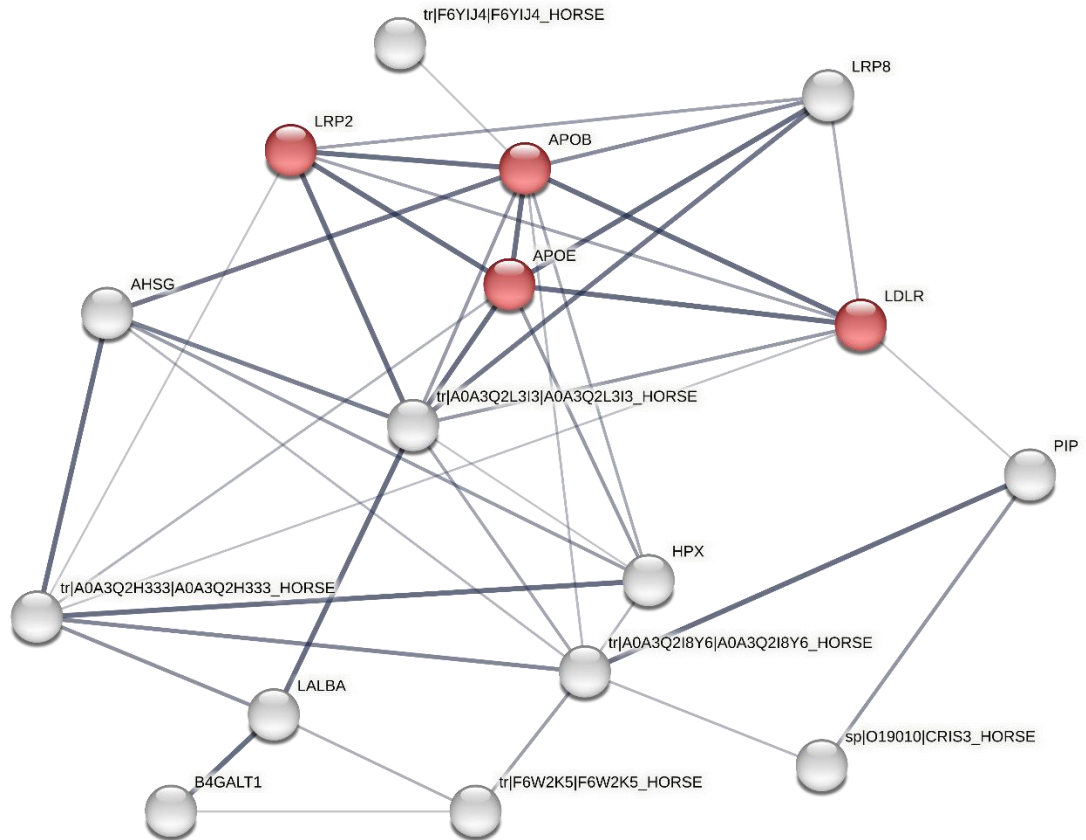
APÊNDICE F

Interação entre as proteínas identificadas e validadas estatisticamente, adotando escore 0,400 obtidas pelo aplicativo STRING 11.5.



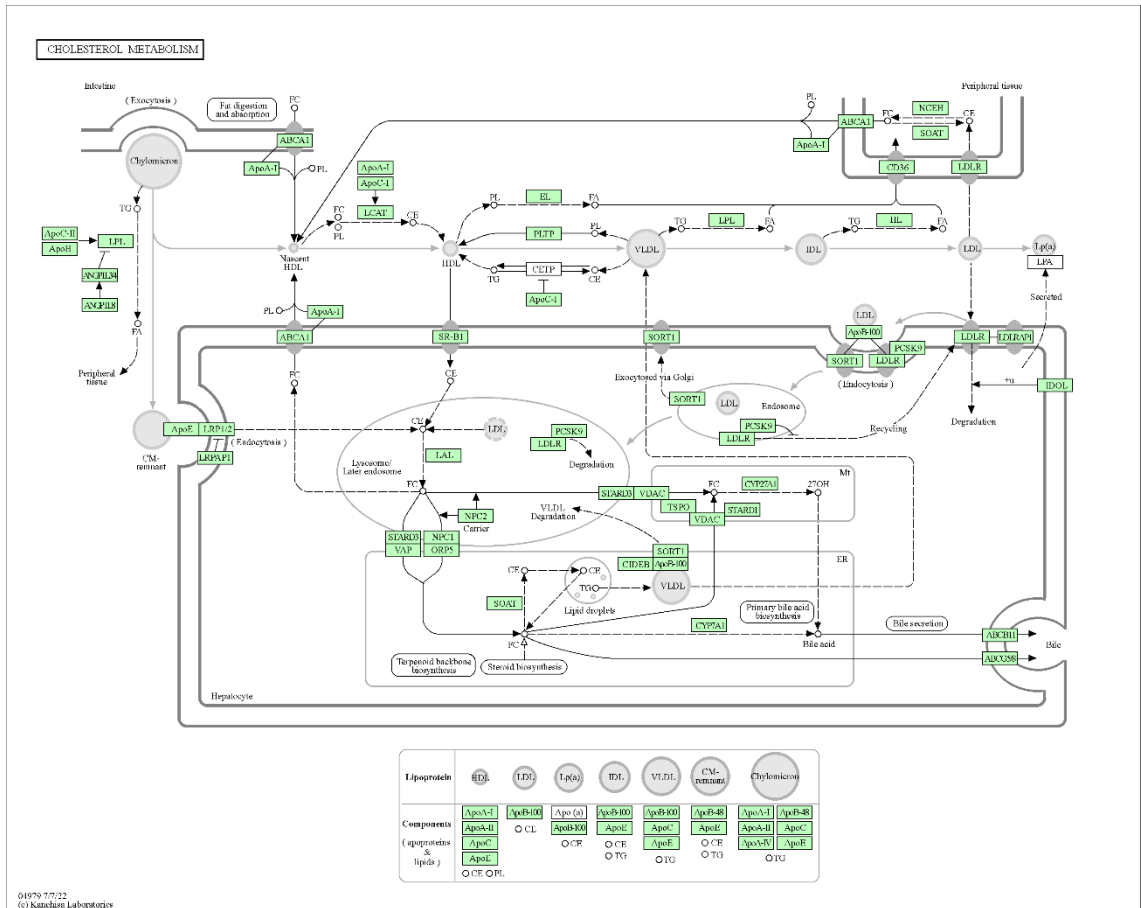
APÊNDICE G

Interações primárias e secundárias entre as proteínas identificadas e outras proteínas anotadas no aplicativo STRING 11.5.



APÊNDICE H

Representação esquemática da via do metabolismo do colesterol. Fonte: KEGG.



APÊNCIDE I

Correlação de Person

Correlations (TABELA TESE DOUTORADO (1)) Marked correlations are significant at $p < .05000N=15$ (Casewise deletion of missing data)

Variable	IDADE	Concentração (milhões/ml)	Teste Hiposmótico (C, Viáveis)	Fluorescencia (C, Verde)	Normais	Defeitos Maiores	Defeitos menores	Fertilidade (%)	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Motilidade Circular
Variable	1,0000	-,3788	-,3669	-,3205	-,0110	-,1038	-,0713	-,1387	-,1768	-,2825	-,3572
IDADE	p= --	p= 164	p= 179	p= 244	p= 969	p= 713	p= 801	p= 622	p= 528	p= 308	p= 191
Concentração (milhões/ml)	-,3788	1,0000	-,3146	-,3360	-,3495	-,2025	-,4566	-,1464	-,3195	-,2252	-,0656
	p= 164	p= --	p= 253	p= 221	p= 202	p= 469	p= 087	p= 603	p= 246	p= 420	p= 816
Teste Hiposmótico (C, Viáveis)	-,3669	-,3146	1,0000	-,8956	-,0601	-,2729	-,1109	-,0766	-,7779	-,3419	-,1653
	p= 179	p= 253	p= --	p= 000	p= 831	p= 325	p= 694	p= 786	p= 001	p= 212	p= 556
Fluorescencia (C, Verde)	-,3205	-,3360	-,8956	1,0000	-,1678	-,4170	-,0967	-,0857	-,7193	-,2334	-,1543
	p= 244	p= 221	p= 000	p= --	p= 550	p= 122	p= 732	p= 761	p= 003	p= 402	p= 583
Normais	-,0110	-,3495	-,0601	-,1678	1,0000	-,2485	-,8031	-,3082	-,1895	-,5819	-,2029
	p= 969	p= 202	p= 831	p= 550	p= --	p= 372	p= 000	p= 267	p= 499	p= 023	p= 468
Defeitos Maiores	-,1038	-,2025	-,2729	-,4170	-,2485	1,0000	-,3774	-,0149	-,1950	-,0406	-,1427
	p= 713	p= 469	p= 325	p= 122	p= 372	p= --	p= 166	p= 958	p= 486	p= 886	p= 612
Defeitos menores	-,0713	-,4566	-,1109	-,0967	-,8031	-,3774	1,0000	-,2975	-,0600	-,5303	-,1085
	p= 801	p= 087	p= 694	p= 732	p= 000	p= 166	p= --	p= 282	p= 832	p= 042	p= 700
Fertilidade (%)	-,1387	-,1464	-,0766	-,0857	-,3062	-,0149	-,2975	1,0000	-,3183	-,3771	-,0443
	p= 622	p= 603	p= 786	p= 761	p= 267	p= 282	p= --	p= 282	p= 832	p= 042	p= 700
Motilidade Total	-,1768	-,3195	-,7779	-,7193	-,1895	-,1950	-,0600	-,3183	1,0000	-,6122	-,2899
	p= 528	p= 246	p= 001	p= 003	p= 499	p= 486	p= 832	p= 248	p= --	p= 015	p= 295
Motilidade Progressiva	-,2825	-,2252	-,3419	-,2334	-,5819	-,0406	-,5303	-,3771	-,6122	1,0000	-,3985
	p= 308	p= 420	p= 212	p= 402	p= 023	p= 886	p= 042	p= 166	p= 015	p= --	p= 141
Motilidade Circular	-,3572	-,0656	-,1653	-,1543	-,2029	-,1427	-,1085	-,0443	-,2899	-,3985	1,0000
	p= 191	p= 816	p= 556	p= 583	p= 468	p= 612	p= 700	p= 876	p= 295	p= 141	p= --
Motilidade Rápidos	-,1733	-,2074	-,0349	-,2074	-,2740	-,1010	-,3264	-,0669	-,3534	-,6540	-,1348
	p= 537	p= 458	p= 902	p= 462	p= 323	p= 720	p= 235	p= 813	p= 196	p= 008	p= 632
Motilidade Lentos	-,4462	-,1729	-,4501	-,4442	-,5494	-,0918	-,4648	-,4510	-,4817	-,7726	-,1963
	p= 095	p= 538	p= 092	p= 097	p= 034	p= 745	p= 081	p= 092	p= 069	p= 001	p= 483
Motilidade Local	-,0388	-,6045	-,6428	-,6713	-,3244	-,2152	-,4432	-,0616	-,6399	-,2134	-,0449
	p= 891	p= 017	p= 010	p= 006	p= 238	p= 441	p= 098	p= 827	p= 010	p= 445	p= 874
Imoveis	-,2066	-,2565	-,7736	-,7475	-,1498	-,1959	-,3059	-,0218	-,9823	-,5902	-,2560
	p= 460	p= 356	p= 001	p= 001	p= 594	p= 484	p= 939	p= 288	p= 000	p= 021	p= 357
Velocidade (VCL) [µm/s]	-,0254	-,3956	-,4881	-,4881	-,5034	-,0250	-,4678	-,3039	-,7730	-,8370	-,3942
	p= 928	p= 603	p= 065	p= 144	p= 056	p= 930	p= 079	p= 271	p= 001	p= 000	p= 146
Velocidade (VSL) [µm/s]	-,0617	-,0749	-,3525	-,1810	-,4011	-,0073	-,3809	-,3954	-,6571	-,8710	-,4009
	p= 827	p= 791	p= 198	p= 519	p= 138	p= 979	p= 161	p= 145	p= 008	p= 000	p= 139
Velocidade (VAP)	-,0141	-,1137	-,4017	-,2513	-,4250	-,0195	-,3963	-,3447	-,7097	-,8511	-,4201
	p= 960	p= 687	p= 138	p= 366	p= 114	p= 945	p= 144	p= 208	p= 003	p= 000	p= 119
Linearidade	-,0233	-,3556	-,7138	-,7138	-,1806	-,0882	-,1159	-,0772	-,7504	-,2918	-,0229
	p= 934	p= 193	p= 003	p= 001	p= 520	p= 755	p= 681	p= 785	p= 001	p= 291	p= 935
BCF [Hz]	-,2900	-,0058	-,6019	-,4608	-,3240	-,1634	-,2083	-,4226	-,8616	-,8215	-,1799
	p= 294	p= 984	p= 018	p= 084	p= 239	p= 561	p= 456	p= 117	p= 000	p= 000	p= 521
ALH [µm]	-,0506	-,1640	-,5070	-,4850	-,5695	-,0255	-,5289	-,2617	-,7642	-,7710	-,3536
	p= 858	p= 559	p= 054	p= 067	p= 027	p= 928	p= 043	p= 346	p= 001	p= 001	p= 196
71	-,3195	-,0216	-,4228	-,4655	-,1130	-,1736	-,0017	-,6251	-,6071	-,2642	-,1667
	p= 246	p= 939	p= 116	p= 080	p= 688	p= 536	p= 995	p= 013	p= 016	p= 341	p= 553
72	-,5022	-,2739	-,1576	-,0526	-,1208	-,1495	-,0158	-,2955	-,1215	-,1564	-,1863
	p= 056	p= 323	p= 575	p= 852	p= 668	p= 595	p= 955	p= 285	p= 666	p= 578	p= 506
77	-,0541	-,3041	-,2256	-,2729	-,2177	-,5431	-,1293	-,5288	-,3154	-,2236	-,5313
	p= 848	p= 271	p= 419	p= 325	p= 436	p= 036	p= 646	p= 043	p= 252	p= 423	p= 042
78	-,0006	-,1697	-,0461	-,3312	-,1178	-,6521	-,2903	-,0987	-,0020	-,1071	-,1161
	p= 998	p= 545	p= 870	p= 228	p= 676	p= 008	p= 294	p= 726	p= 994	p= 704	p= 680
83	-,2683	-,3598	-,0407	-,2108	-,2113	-,7010	-,2353	-,0187	-,1140	-,0721	-,0778
	p= 334	p= 188	p= 886	p= 451	p= 450	p= 004	p= 399	p= 947	p= 686	p= 798	p= 783
84	-,2678	-,5113	-,0021	-,2511	-,0816	-,4789	-,2200	-,1775	-,1321	-,0022	-,1848
	p= 335	p= 051	p= 994	p= 367	p= 773	p= 071	p= 431	p= 527	p= 639	p= 994	p= 510
85	-,1050	-,2243	-,0841	-,0598	-,1698	-,1538	-,0636	-,3359	-,0942	-,1889	-,2283
	p= 710	p= 422	p= 766	p= 832	p= 545	p= 584	p= 822	p= 221	p= 738	p= 500	p= 413
86	-,1366	-,4196	-,2374	-,2436	-,2587	-,2436	-,4015	-,0538	-,4178	-,0355	-,0732
	p= 627	p= 119	p= 394	p= 083	p= 352	p= 382	p= 138	p= 849	p= 121	p= 900	p= 796
88	-,7969	-,1627	-,4209	-,3302	-,1413	-,2417	-,0201	-,0431	-,2137	-,2404	-,4036
	p= 000	p= 562	p= 118	p= 229	p= 615	p= 386	p= 943	p= 879	p= 444	p= 388	p= 136
89	-,0953	-,3664	-,0415	-,2257	-,0601	-,2471	-,0994	-,1922	-,2097	-,0898	-,1490
	p= 735	p= 179	p= 883	p= 419	p= 832	p= 375	p= 724	p= 492	p= 453	p= 750	p= 596
90	-,1841	-,3664	-,0962	-,2452	-,0212	-,2787	-,1475	-,2511	-,2074	-,1636	-,1631
	p= 511	p= 179	p= 733	p= 378	p= 940	p= 314	p= 600	p= 367	p= 458	p= 560	p= 561
99	-,3932	-,3999	-,0324	-,1188	-,1136	-,6680	-,3076	-,2357	-,0423	-,1373	-,0215
	p= 147	p= 140	p= 909	p= 673	p= 687	p= 006	p= 265	p= 398	p= 881	p= 626	p= 939
100	-,1864	-,3491	-,2677	-,2651	-,3468	-,1511	-,4195	-,3617	-,2413	-,5708	-,0436

Correlations (TABELA TESE DOUTORADO (1)) Marked correlations are significant at p < .05000N=15 (Casewise deletion of missing data)

Variable	IDADE	Concentração (milhões/ml)	Teste Hiposmótico (C, Viáveis)	Fluorescencia (C, Verde)	Normais	Defeitos Maiores	Defeitos menores	Fertilidade (%)	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Motilidade Circular
	p=.506	p=.202	p=.335	p=.340	p=.205	p=.591	p=.120	p=.185	p=.386	p=.026	p=.877
101	.7546	-.3721	-.1711	.2928	-.0296	-.1780	.0795	-.1724	.2455	.3923	.2911
	p=.001	p=.172	p=.542	p=.290	p=.917	p=.526	p=.778	p=.539	p=.378	p=.148	p=.292
104	.1282	.3398	.0379	.1055	-.3708	-.3342	.5561	-.3979	.1130	-.1275	.2677
	p=.649	p=.215	p=.893	p=.708	p=.174	p=.223	p=.031	p=.142	p=.688	p=.651	p=.335
107	.4869	-.2321	.2438	.2261	-.0838	.5036	-.2354	.2747	.2956	.2743	-.0120
	p=.066	p=.405	p=.381	p=.418	p=.766	p=.056	p=.398	p=.322	p=.285	p=.323	p=.966
123	-.1288	-.0363	.1050	.2491	.5156	-.2076	-.3660	.4456	.1583	.3575	.0740
	p=.647	p=.898	p=.710	p=.371	p=.049	p=.458	p=.180	p=.096	p=.573	p=.191	p=.793
127	.5749	-.4303	-.0728	-.0821	.1176	-.3534	.1047	.2574	-.1522	.0781	.5152
	p=.025	p=.109	p=.796	p=.771	p=.676	p=.196	p=.710	p=.354	p=.588	p=.782	p=.049
128	.5322	-.2448	-.0615	-.0849	-.0023	-.2992	-.1868	.1860	-.0855	.0639	.6594
	p=.041	p=.379	p=.828	p=.763	p=.993	p=.279	p=.505	p=.507	p=.762	p=.821	p=.007
130	.1920	-.2640	-.1565	-.4141	-.2189	.0338	.1865	-.3518	-.2404	.1013	-.1933
	p=.493	p=.342	p=.578	p=.125	p=.433	p=.905	p=.506	p=.199	p=.388	p=.719	p=.490
131	.4455	-.6904	-.2846	-.1537	.2422	.0196	-.2459	.3126	-.0537	.4043	.0322
	p=.096	p=.004	p=.304	p=.584	p=.384	p=.945	p=.377	p=.257	p=.849	p=.135	p=.909
132	.7923	-.5319	-.0855	-.1162	-.0770	-.0479	.1024	.1382	-.2310	.1963	.3785
	p=.000	p=.041	p=.762	p=.680	p=.785	p=.865	p=.717	p=.623	p=.407	p=.483	p=.164
133	.2715	-.3829	.0627	-.1976	-.2115	.5048	-.1123	.1482	-.0482	.0032	-.2167
	p=.328	p=.159	p=.824	p=.480	p=.449	p=.055	p=.690	p=.598	p=.865	p=.991	p=.438
134	.4166	-.3601	.0999	-.0003	-.1315	.3205	-.0778	.2222	.2324	.2110	-.0939
	p=.122	p=.187	p=.723	p=.999	p=.640	p=.244	p=.783	p=.426	p=.405	p=.450	p=.739
135	.3632	.0946	.0943	.0940	-.2552	-.2400	.3919	-.4708	.0668	.0473	.3681
	p=.183	p=.737	p=.738	p=.739	p=.359	p=.389	p=.149	p=.077	p=.813	p=.867	p=.177
] PROTEINAmg/ml	-.3741	.2640	-.3568	-.2828	-.1863	-.2601	.3394	.3616	-.3345	-.3070	-.2472
	p=.189	p=.342	p=.192	p=.307	p=.506	p=.349	p=.216	p=.185	p=.223	p=.266	p=.375
VOLUME TOTAL DO EJACULADO	-.0469	-.1036	.1453	.2098	-.0011	-.1746	.1087	.3597	.3999	.1748	-.2389
	p=.868	p=.713	p=.605	p=.453	p=.997	p=.534	p=.700	p=.188	p=.140	p=.533	p=.391
Total de Proteínas/ Ejaculado	-.2084	.0512	-.0423	.0392	-.1149	-.2006	.2336	.4461	.1585	-.0225	-.3392
	p=.456	p=.856	p=.881	p=.890	p=.683	p=.473	p=.402	p=.096	p=.573	p=.937	p=.216
TRIPTOFANO	.2009	.4182	.2754	.0611	-.5524	-.3175	.7250	.0055	.2901	.0264	.2241
	p=.473	p=.121	p=.321	p=.829	p=.033	p=.249	p=.002	p=.984	p=.294	p=.926	p=.422
FRUTOSE	.4210	.1761	.1242	-.0977	-.3384	-.1148	.3929	.0497	.1015	.2269	.5804
	p=.118	p=.530	p=.659	p=.729	p=.217	p=.684	p=.147	p=.861	p=.719	p=.416	p=.023
ÁCIDO LÁTICO	.1345	.0525	-.3559	-.2820	-.3545	-.0930	.1493	-.4223	-.3623	-.2749	.1243
	p=.633	p=.853	p=.193	p=.309	p=.195	p=.742	p=.147	p=.117	p=.184	p=.321	p=.659
ORNITINA	.4622	-.2658	.2361	.3400	-.2645	.0084	.2443	-.1054	.2129	-.0597	.2018
	p=.083	p=.338	p=.397	p=.215	p=.341	p=.976	p=.380	p=.708	p=.446	p=.833	p=.471
MELATONINA	-.2534	.1836	-.0560	-.2461	-.1115	-.2337	.2500	.2078	-.2496	-.1402	-.1684
	p=.362	p=.513	p=.843	p=.377	p=.692	p=.402	p=.369	p=.457	p=.370	p=.618	p=.549
Acetil Carnitina	.0538	.1710	.2984	.0978	-.2622	-.3266	.4470	-.1553	-.0616	-.3236	.1165
	p=.849	p=.542	p=.280	p=.729	p=.345	p=.235	p=.095	p=.581	p=.827	p=.239	p=.679
Carnitina	.3020	.1688	.3431	.3340	.0597	-.7660	.4102	.1926	.1904	.1429	-.0602
	p=.274	p=.548	p=.211	p=.224	p=.833	p=.001	p=.129	p=.492	p=.497	p=.611	p=.831
Fenilalanina	.2357	.2898	.3099	.0388	-.3951	-.2527	.5332	-.0980	.3039	.3030	.2653
	p=.398	p=.295	p=.261	p=.891	p=.145	p=.363	p=.041	p=.728	p=.271	p=.272	p=.339
Isoleucina_ leucina	.2523	.2764	.0472	-.1879	-.7283	-.0363	.7161	-.2105	-.0258	-.2127	-.1809
	p=.364	p=.319	p=.867	p=.503	p=.002	p=.898	p=.003	p=.452	p=.927	p=.447	p=.519
Methylbutanoyl Carnitina	.4549	-.3257	.0976	-.0340	-.2441	-.2825	.4066	.0728	-.1823	-.0853	-.1456
	p=.088	p=.236	p=.729	p=.904	p=.381	p=.308	p=.133	p=.796	p=.516	p=.762	p=.605
ACIDO CITRICO	-.1009	.4726	.0366	-.0280	-.6617	-.1149	.7020	-.1733	.1545	-.1418	.1764
	p=.721	p=.075	p=.897	p=.921	p=.007	p=.683	p=.004	p=.537	p=.582	p=.614	p=.529
ACIDO HIPURICO	-.0778	-.3754	.1085	-.0917	.1375	.0912	-.1850	.0701	.1790	.2369	-.1205
	p=.783	p=.168	p=.700	p=.745	p=.625	p=.747	p=.509	p=.804	p=.523	p=.395	p=.669
1,3-DIOXAN-5-OL	-.3294	-.1693	-.6047	-.5714	-.1566	.3149	-.0451	-.5102	-.6043	-.4096	-.1543
	p=.231	p=.546	p=.017	p=.026	p=.577	p=.253	p=.873	p=.052	p=.017	p=.129	p=.583
ÁCIDO ESTEÁRICO	.1739	-.3319	.0193	-.2520	-.0398	.0193	.0208	-.0092	-.0916	.0565	-.1043
	p=.535	p=.227	p=.947	p=.365	p=.888	p=.946	p=.941	p=.974	p=.746	p=.841	p=.711
ÁCIDO FOSFÓRICO	.2733	-.1138	.6162	.6306	.3098	-.2858	-.1191	.6471	.7157	.5145	.0751
	p=.324	p=.686	p=.014	p=.012	p=.261	p=.302	p=.672	p=.009	p=.003	p=.050	p=.790
ÁCIDO OLEICO	.2018	.0719	.2905	.3179	.0584	-.1137	.0128	-.5637	-.1075	-.1460	.0382
	p=.471	p=.799	p=.294	p=.248	p=.836	p=.687	p=.964	p=.029	p=.703	p=.604	p=.893
ÁCIDO PALMÍTICO	.1442	.3700	.2850	.1736	-.2239	-.5980	.5801	.0608	.2624	-.0030	.2290
	p=.608	p=.175	p=.303	p=.536	p=.422	p=.019	p=.023	p=.830	p=.345	p=.992	p=.412
TAURINA	.1453	.2078	.0593	-.0451	-.3881	-.2870	.5502	.3248	.1956	.1100	.3286
	p=.605	p=.457	p=.834	p=.873	p=.153	p=.300	p=.034	p=.238	p=.485	p=.696	p=.232

Variable	Motilidade Rápidos	Motilidade Lentos	Motilidade Local	Imoveis	Velocidade (VCL) [µm/s]	Velocidade (VSL) [µm/s]	Velocidade (VAP)	Linearidade	BCF [Hz]	ALH [µm]	71	72	77	78
IDADE	-,1733 p= 537	,4462 p= 095	-,0388 p= 891	-,2066 p= 460	,0254 p= 928	,0617 p= 827	,0141 p= 960	-,0233 p= 934	,2900 p= 294	-,0506 p= 858	-,3195 p= 246	-,5022 p= 056	,0541 p= 848	-,0006 p= 998
Concentração (milhões/ml)	-,2074 p= 458	-,1729 p= 538	,6045 p= 017	-,2565 p= 356	,1461 p= 603	,0749 p= 791	-,3565 p= 687	-,0216 p= 193	,1640 p= 984	-,0058 p= 559	-,0216 p= 939	-,1576 p= 323	-,3041 p= 271	-,1697 p= 545
Teste Hiposmótico (C, Viáveis)	-,0349 p= 902	,4501 p= 092	,6428 p= 010	-,7736 p= 001	,4881 p= 065	,3525 p= 198	,4017 p= 138	-,7138 p= 003	,6019 p= 018	,5070 p= 054	-,4228 p= 116	-,1576 p= 575	-,2256 p= 419	-,0461 p= 870
Fluorescencia (C, Verde)	-,2057 p= 462	,4442 p= 097	,6713 p= 006	-,7475 p= 001	,3956 p= 144	,1810 p= 519	,2513 p= 366	-,7701 p= 001	,4608 p= 084	,4850 p= 067	-,4655 p= 080	,0526 p= 852	-,2729 p= 325	-,3312 p= 228
Normais	,2740 p= 323	,5494 p= 034	-,3244 p= 238	-,1498 p= 594	,5034 p= 056	,4011 p= 138	,4250 p= 114	-,1130 p= 520	,3240 p= 239	,5695 p= 027	-,1208 p= 688	,1208 p= 668	,2177 p= 436	-,1178 p= 676
Defeitos Maiores	,1010 p= 720	-,0918 p= 745	-,2152 p= 441	-,1959 p= 484	-,0250 p= 930	-,0073 p= 979	-,0195 p= 945	,0882 p= 755	-,1634 p= 561	-,0255 p= 928	,1736 p= 536	-,1495 p= 595	-,5431 p= 036	-,6521 p= 008
Defeitos menores	-,3264 p= 235	-,4648 p= 081	,4432 p= 098	,0218 p= 939	-,4678 p= 079	-,3809 p= 161	-,3963 p= 144	,1159 p= 681	-,2083 p= 456	-,5289 p= 043	,0017 p= 995	-,0158 p= 955	,1293 p= 646	-,2903 p= 294
Fertilidade (%)	,0669 p= 813	,4510 p= 092	,0616 p= 827	-,3059 p= 268	,3039 p= 271	,3954 p= 145	,3447 p= 208	,0772 p= 785	,4226 p= 117	,2617 p= 346	-,6251 p= 013	-,2955 p= 285	-,5288 p= 043	,0987 p= 726
Motilidade Total	,3534 p= 196	,4817 p= 069	,6399 p= 010	-,9823 p= 000	,7730 p= 001	,6571 p= 008	,7097 p= 003	-,7504 p= 001	,8616 p= 000	,7642 p= 001	-,6071 p= 016	-,1215 p= 666	,3154 p= 252	,0020 p= 994
Motilidade Progressiva	,6540 p= 008	,7726 p= 001	-,2134 p= 445	-,5902 p= 021	,8370 p= 000	,8710 p= 000	,8511 p= 000	-,2918 p= 291	,8215 p= 000	,7710 p= 001	-,2642 p= 341	-,1564 p= 578	,2236 p= 423	,1071 p= 704
Motilidade Circular	,1348 p= 632	,1963 p= 483	-,0449 p= 874	-,2560 p= 357	,3942 p= 146	,4009 p= 139	,4201 p= 119	-,0229 p= 935	-,1799 p= 521	,3536 p= 196	-,1667 p= 553	-,1863 p= 506	,5313 p= 042	,1161 p= 680
Motilidade Rápidos	1,0000 p= --	,0595 p= 833	-,2037 p= 467	-,3517 p= 199	,6545 p= 008	,7319 p= 002	,7393 p= 002	-,1126 p= 689	,5685 p= 027	,5550 p= 032	,0128 p= 964	-,0402 p= 887	-,0765 p= 786	,3423 p= 212
Motilidade Lentos	,0595 p= 833	1,0000 p= --	-,1470 p= 601	-,4615 p= 083	,5334 p= 041	,5160 p= 049	,4756 p= 073	-,3007 p= 276	,6333 p= 011	,5338 p= 040	-,3207 p= 244	-,1377 p= 625	-,2287 p= 412	-,1706 p= 543
Motilidade Local	-,2037 p= 467	-,1470 p= 601	1,0000 p= --	-,6381 p= 010	,1427 p= 612	,0536 p= 923	-,6397 p= 849	-,0274 p= 923	-,6397 p= 849	-,1935 p= 490	-,5126 p= 051	-,0035 p= 990	-,1890 p= 500	-,0888 p= 753
Imoveis	-,3517 p= 199	-,4615 p= 083	-,6381 p= 010	1,0000 p= --	,7266 p= 002	-,6634 p= 016	-,6634 p= 007	-,7355 p= 002	-,8468 p= 000	-,7243 p= 002	-,6148 p= 015	-,1323 p= 638	-,2782 p= 315	,0620 p= 826
Velocidade (VCL) [µm/s]	,6545 p= 008	,5334 p= 041	,1427 p= 612	-,7266 p= 002	1,0000 p= --	,9368 p= 000	,9706 p= 000	-,5581 p= 031	,7549 p= 001	,9706 p= 000	-,3025 p= 273	-,0157 p= 956	-,2996 p= 278	,2752 p= 321
Velocidade (VSL) [µm/s]	,7319 p= 002	,5160 p= 049	-,0274 p= 923	-,6085 p= 016	1,0000 p= --	,9890 p= 000	,9890 p= 000	-,2795 p= 313	,7515 p= 001	,8370 p= 000	-,2920 p= 291	-,1799 p= 521	-,3572 p= 191	,3481 p= 204
Velocidade (VAP)	,7393 p= 002	,4756 p= 073	,0536 p= 849	-,6634 p= 007	1,0000 p= 000	,9890 p= 000	1,0000 p= --	-,3804 p= 162	,7509 p= 001	,8949 p= 000	-,2946 p= 287	-,1181 p= 675	-,3413 p= 204	,3413 p= 213
Linearidade	-,1126 p= 689	-,3007 p= 276	-,6397 p= 010	-,7355 p= 002	-,5581 p= 031	-,2795 p= 313	-,3804 p= 162	1,0000 p= --	-,4990 p= 058	-,6734 p= 006	,2078 p= 457	-,3758 p= 168	,0315 p= 911	,0644 p= 820
BCF [Hz]	,5685 p= 027	,6333 p= 011	,2726 p= 326	-,8468 p= 000	,7549 p= 001	,7515 p= 001	,7509 p= 001	-,4990 p= 058	1,0000 p= --	,6777 p= 006	-,4998 p= 058	-,2640 p= 342	-,0086 p= 463	-,0086 p= 976
ALH [µm]	,5550 p= 032	,5338 p= 040	,1935 p= 490	-,7243 p= 000	,9706 p= 000	,8370 p= 000	,8949 p= 000	-,6734 p= 006	,6777 p= 006	1,0000 p= --	-,2737 p= 324	-,1422 p= 613	,2712 p= 328	,2028 p= 468
71	,0128 p= 964	-,3207 p= 244	-,5126 p= 051	-,6148 p= 015	-,3025 p= 273	-,2920 p= 291	-,2946 p= 287	-,2078 p= 457	-,4998 p= 058	-,2737 p= 324	1,0000 p= --	-,5242 p= 045	-,3040 p= 271	-,0365 p= 897
72	-,0402 p= 887	-,1377 p= 625	-,0035 p= 990	-,1323 p= 638	-,0157 p= 956	-,1799 p= 521	-,1181 p= 675	-,3758 p= 168	-,2640 p= 342	,1422 p= 613	-,5242 p= 045	1,0000 p= --	-,0028 p= 992	-,3049 p= 269
77	-,0765 p= 786	,2287 p= 412	-,1890 p= 500	-,2782 p= 315	,2996 p= 278	,3572 p= 191	,3481 p= 204	,0315 p= 911	-,2051 p= 463	,2712 p= 328	-,3040 p= 271	-,0028 p= 992	1,0000 p= --	-,1787 p= 524
78	,3423 p= 212	-,1706 p= 543	-,0888 p= 753	,0620 p= 826	,2752 p= 321	,3481 p= 204	,3413 p= 213	,0644 p= 820	-,0086 p= 976	,2028 p= 468	-,0365 p= 897	-,3049 p= 269	-,1787 p= 524	1,0000 p= --
83	,0032 p= 991	-,0777 p= 783	-,0765 p= 786	,1028 p= 716	-,0221 p= 938	,0020 p= 994	-,0148 p= 958	,1409 p= 616	-,1133 p= 688	-,0728 p= 796	-,1354 p= 630	-,5876 p= 021	-,4712 p= 076	,7097 p= 003
84	,1002 p= 722	-,0430 p= 879	-,1422 p= 613	-,1341 p= 634	-,0216 p= 939	,0829 p= 769	,0424 p= 881	,2769 p= 318	-,0135 p= 962	-,1081 p= 701	-,2136 p= 445	-,6593 p= 008	-,3031 p= 272	,7339 p= 002
85	-,0483 p= 864	-,1672 p= 551	-,0634 p= 822	,0986 p= 727	-,2089 p= 456	-,1891 p= 500	-,1896 p= 499	,1170 p= 678	-,1011 p= 720	-,2403 p= 388	-,2481 p= 373	-,5026 p= 056	-,5551 p= 032	,3139 p= 255
86	,2162 p= 439	-,2136 p= 445	-,4587 p= 085	,4565 p= 087	-,0496 p= 861	,0709 p= 802	,0458 p= 871	,4821 p= 069	-,2210 p= 429	-,1099 p= 697	-,1947 p= 487	-,3368 p= 220	-,1170 p= 678	,5529 p= 033
88	-,0852 p= 763	,3031 p= 272	-,2469 p= 886	-,375 p= 375	,2297 p= 410	,2268 p= 416	,2080 p= 457	-,1406 p= 617	-,1681 p= 549	-,1689 p= 547	-,2146 p= 443	-,4675 p= 079	-,0105 p= 970	,3593 p= 188
89	,0579 p= 838	-,1344 p= 633	-,1678 p= 550	-,2154 p= 441	-,1494 p= 595	-,1494 p= 829	-,0838 p= 767	,3206 p= 244	-,1380 p= 624	-,2098 p= 453	-,2093 p= 454	-,5929 p= 020	-,4675 p= 079	,4701 p= 077
90	,0748 p= 791	-,2596 p= 350	,4063 p= 133	-,2011 p= 472	,0689 p= 807	-,1292 p= 646	-,0532 p= 851	-,5212 p= 046	,1062 p= 706	,1331 p= 636	,2177 p= 436	-,5107 p= 052	-,0669 p= 813	-,3697 p= 175
99	,1068 p= 705	,1030 p= 715	-,0781 p= 782	-,0660 p= 815	,1656 p= 555	,2033 p= 467	,1762 p= 530	,0750 p= 791	,0801 p= 777	,0993 p= 725	-,2363 p= 396	-,5865 p= 022	-,2733 p= 324	,6972 p= 004
100	,7686	,1807	-,2547	-,2520	4,532	,4955	,4901	-,1154	,4791	,4260	-,0412	,2351	-,0396	,1244

Variable	Motilidade Rápidos	Motilidade Lentos	Motilidade Local	Imoveis	Velocidade (VCL) [µm/s]	Velocidade (VSL) [µm/s]	Velocidade (VAP)	Linearidade	BCF [Hz]	ALH [µm]	71	72	77	78
	p=.001	p=.519	p=.360	p=.365	p=.090	p=.060	p=.064	p=.682	p=.071	p=.113	p=.884	p=.399	p=.889	p=.659
101	.0150	.4714	-.0785	-.3393	.0730	.1138	-.0052	.3604	.0226	-.4541	-.3640	.0035	-.3029	-.3029
	p=.958	p=.076	p=.781	p=.216	p=.796	p=.686	p=.796	p=.985	p=.187	p=.936	p=.089	p=.182	p=.990	p=.272
104	-.0864	-.1760	-.2428	-.1106	-.0697	-.0712	-.0570	.0162	-.1492	-.2630	-.1277	-.0262	-.1896	-.1896
	p=.760	p=.530	p=.383	p=.695	p=.718	p=.801	p=.805	p=.954	p=.840	p=.596	p=.344	p=.650	p=.926	p=.499
107	.0863	.3197	.1033	-.3556	.3061	.2759	.2609	-.2133	.2797	.2730	-.4167	-.4495	-.2720	.3932
	p=.760	p=.245	p=.714	p=.193	p=.267	p=.320	p=.348	p=.445	p=.313	p=.325	p=.122	p=.093	p=.327	p=.147
123	.0212	.4786	-.1505	-.2031	.3656	.3670	.3564	.0561	.1513	.3997	-.2447	-.0776	.4510	-.2223
	p=.940	p=.071	p=.592	p=.468	p=.180	p=.178	p=.192	p=.843	p=.590	p=.140	p=.379	p=.783	p=.092	p=.426
127	-.1324	.0795	-.2435	.1411	-.2184	-.0647	-.1163	.5031	-.0184	-.3030	-.3357	-.4913	.3886	-.0624
	p=.638	p=.778	p=.382	p=.616	p=.434	p=.819	p=.680	p=.056	p=.948	p=.272	p=.221	p=.063	p=.152	p=.825
128	-.1448	.0333	-.1568	.0959	-.1923	-.0487	-.0911	.4344	-.0180	-.2770	-.2934	-.4186	.4330	-.0466
	p=.607	p=.906	p=.577	p=.734	p=.492	p=.863	p=.747	p=.106	p=.949	p=.318	p=.288	p=.120	p=.107	p=.869
130	.2094	.0110	-.3594	.2349	-.1016	.2162	.0969	.6366	.0856	-.2928	-.0451	-.5285	.1127	.2885
	p=.454	p=.969	p=.188	p=.399	p=.719	p=.439	p=.731	p=.011	p=.762	p=.290	p=.873	p=.043	p=.689	p=.297
131	.3130	.3137	-.4551	-.0515	.0697	.1651	.1090	.2605	.2309	.0114	-.2288	-.2580	-.1185	-.1275
	p=.256	p=.255	p=.088	p=.855	p=.805	p=.557	p=.699	p=.348	p=.408	p=.968	p=.412	p=.353	p=.674	p=.651
132	-.0591	.2300	-.4568	.1722	-.1718	-.0050	-.0861	.4147	-.0036	-.2718	.0035	-.3419	.1361	.0061
	p=.834	p=.409	p=.087	p=.539	p=.540	p=.986	p=.760	p=.124	p=.990	p=.327	p=.990	p=.212	p=.629	p=.983
133	.0910	-.0190	-.0476	.0481	-.0008	.1126	.0666	.2274	.0429	-.1013	-.2807	-.7017	-.3507	.7137
	p=.747	p=.946	p=.866	p=.865	p=.998	p=.689	p=.814	p=.415	p=.879	p=.720	p=.311	p=.004	p=.200	p=.003
134	.2113	.1494	.0793	-.2791	.2105	.2444	.3069	.0848	-.4844	-.4844	-.6854	-.2677	.3990	.3990
	p=.450	p=.595	p=.779	p=.314	p=.508	p=.380	p=.451	p=.893	p=.266	p=.764	p=.067	p=.005	p=.335	p=.141
135	.1147	-.1311	.0374	-.0535	.0082	-.0051	.0093	-.2174	.0146	-.0051	.1741	.2815	-.0671	-.0264
	p=.684	p=.641	p=.895	p=.850	p=.977	p=.986	p=.974	p=.436	p=.959	p=.951	p=.535	p=.309	p=.812	p=.926
[] PROTEÍNAmg/ml	-.1536	-.2536	-.0884	.3191	-.3402	-.1567	-.2169	.5253	-.2567	-.0002	.0786	.3814	-.3073	-.3073
	p=.585	p=.362	p=.754	p=.246	p=.215	p=.577	p=.437	p=.044	p=.356	p=.155	p=.999	p=.781	p=.161	p=.265
VOLUME TOTAL DO EJACULADO	.4503	-.0841	.3383	-.4998	.2156	.1982	.2273	-.2466	.4725	.1963	-.3062	.0217	.0810	-.1903
	p=.092	p=.766	p=.218	p=.058	p=.440	p=.479	p=.415	p=.376	p=.075	p=.483	p=.267	p=.939	p=.774	p=.497
Total de Proteínas/ Ejaculado	.2743	-.1925	.2418	-.2460	.0050	.0696	.0654	.0291	.2481	-.0293	-.2445	.0451	.1835	-.2665
	p=.322	p=.492	p=.385	p=.377	p=.986	p=.805	p=.817	p=.918	p=.373	p=.918	p=.380	p=.873	p=.513	p=.337
TRIPTOFANO	.0199	-.0496	.3359	-.2477	.0054	.1882	.1371	.1042	.2674	-.1475	-.2267	-.3141	.3669	.0018
	p=.944	p=.861	p=.221	p=.373	p=.985	p=.502	p=.626	p=.712	p=.335	p=.600	p=.417	p=.254	p=.179	p=.995
FRUTOSE	.1013	.0841	-.0916	-.0612	.1502	.3564	.2886	.2581	.1594	-.0174	.0637	-.3066	.4915	.2078
	p=.719	p=.766	p=.745	p=.828	p=.593	p=.192	p=.297	p=.353	p=.570	p=.951	p=.822	p=.266	p=.063	p=.457
ÁCIDO LÁTICO	-.3469	-.1066	-.2185	.3546	-.4475	-.3548	-.4048	.4331	-.3745	-.4942	.1281	-.1794	-.1310	-.2741
	p=.205	p=.705	p=.434	p=.195	p=.094	p=.194	p=.135	p=.107	p=.169	p=.061	p=.649	p=.522	p=.642	p=.323
ORNITINA	-.0444	-.1026	.3060	-.3534	-.1196	-.1854	-.1441	-.1122	.0984	-.1101	-.4039	-.3791	-.1737	-.1259
	p=.875	p=.716	p=.267	p=.196	p=.671	p=.508	p=.608	p=.690	p=.727	p=.696	p=.135	p=.163	p=.536	p=.655
MELATONINA	-.0769	-.0966	-.1507	.2803	-.1924	.0342	-.0377	.5573	-.0975	-.2993	.1017	-.2772	.3715	-.0499
	p=.785	p=.732	p=.592	p=.312	p=.492	p=.904	p=.894	p=.031	p=.730	p=.278	p=.718	p=.317	p=.173	p=.860
Acetil Carnitina	-.1723	-.3617	.2538	.0735	-.2063	-.1130	-.1107	.2680	-.1467	-.2840	-.0998	-.4580	.2568	.1296
	p=.539	p=.185	p=.361	p=.795	p=.461	p=.688	p=.694	p=.334	p=.602	p=.305	p=.723	p=.086	p=.355	p=.645
Carnitina	-.0785	.2686	.1268	-.1914	.0463	.1675	-.1086	.1141	.3024	-.0553	-.3422	-.2858	.3998	-.4343
	p=.781	p=.333	p=.652	p=.494	p=.870	p=.551	p=.700	p=.686	p=.273	p=.845	p=.212	p=.302	p=.140	p=.106
Fenilalanina	.3133	.0921	.0864	-.2700	.2566	.4543	.3981	.0457	.3761	.0858	-.0209	-.2302	.2769	.1315
	p=.256	p=.744	p=.759	p=.330	p=.356	p=.089	p=.142	p=.871	p=.167	p=.761	p=.941	p=.409	p=.318	p=.640
Isoleucina_leucina	-.0684	-.2966	-.1721	.0588	-.1942	.0009	-.0565	.2973	-.0657	-.3569	-.0384	-.4105	.1059	.2674
	p=.809	p=.283	p=.540	p=.835	p=.488	p=.997	p=.841	p=.282	p=.816	p=.192	p=.892	p=.129	p=.707	p=.335
Methylbutanoyl Carnitina	-.1751	.0610	-.1295	-.1117	-.4141	-.2325	-.3091	.4568	.0822	-.5294	-.0036	-.5139	.0817	-.3054
	p=.533	p=.829	p=.646	p=.692	p=.125	p=.404	p=.262	p=.087	p=.771	p=.042	p=.990	p=.050	p=.772	p=.268
ACIDO CITRICO	.0467	-.2849	.3075	-.1805	-.0273	.1075	.0887	.1509	-.0189	-.1262	-.1604	-.1958	.2052	.0139
	p=.869	p=.303	p=.265	p=.520	p=.923	p=.703	p=.753	p=.591	p=.947	p=.654	p=.568	p=.484	p=.463	p=.961
ACIDO HIPURICO	.3424	.0885	-.0270	-.2078	.0369	.0904	.0931	.1006	.3976	-.0105	-.1104	-.4299	-.1757	-.0065
	p=.212	p=.754	p=.924	p=.457	p=.896	p=.749	p=.741	p=.721	p=.142	p=.970	p=.695	p=.110	p=.531	p=.982
1,3-DIOXAN-5-OL	-.1911	-.3461	-.3994	.5881	-.5376	-.5252	-.5297	.4467	-.5416	-.5079	.5410	.0254	-.4452	-.1328
	p=.495	p=.206	p=.140	p=.021	p=.039	p=.044	p=.042	p=.095	p=.037	p=.053	p=.037	p=.928	p=.096	p=.637
ÁCIDO ESTEÁRICO	.1250	.0103	-.1727	.0977	-.1065	.0667	.0080	.4626	.1433	-.2504	-.1211	-.7816	-.1201	.2029
	p=.657	p=.971	p=.538	p=.729	p=.706	p=.813	p=.978	p=.610	p=.368	p=.667	p=.667	p=.001	p=.670	p=.468
ÁCIDO FOSFÓRICO	.2437	.4763	.4259	-.7206	.6034	.5491	.5629	-.5273	.7055	.5945	-.5867	-.0346	.4313	-.0407
	p=.381	p=.073	p=.113	p=.002	p=.017	p=.034	p=.029	p=.043	p=.003	p=.019	p=.022	p=.902	p=.108	p=.885
ÁCIDO OLEICO	-.2306	-.0245	.0087	.1084	-.0926	-.2768	-.2207	-.3956	-.1737	.0017	.5742	.4445	-.1970	-.1913
	p=.408	p=.931	p=.975	p=.701	p=.743	p=.318	p=.429	p=.144	p=.536	p=.995	p=.025	p=.097	p=.482	p=.495
ÁCIDO PALMÍTICO	-.1066	.0190	.3234	-.2264	.0212	.1470	.1119	.1548	.2198	-.1004	-.2668	-.3780	.5657	-.2285
	p=.705	p=.947	p=.240	p=.417	p=.940	p=.601	p=.691	p=.582	p=.431	p=.722	p=.336	p=.165	p=.028	p=.413
TAURINA	.0891	-.0107	.1374	-.2133	.0630	.2770	.2185	.2993	.2038	-.0775	-.2051	-.2778	.6653	-.0432
	p=.752	p=.970	p=.625	p=.445	p=.823	p=.318	p=.434	p=.279	p=.466	p=.784	p=.463	p=.316	p=.007	p=.879

Variable	83	84	85	86	88	89	90	99	100	101	104	107	123	127	128	130	131	132	133	134	135	[[PROTEINAmg/ml
IDADE	,2683	,2678	,1050	-,1366	,7969	,0953	-,1841	,3932	-,1864	,7546	,1282	,4869	-,1288	,5749	,5322	,1920	,4455	,7923	,2715	,4166	,3632	-,3741
Concentração (milhões/ml)	p= 334	p= 335	p= 710	p= 627	p= 000	p= 735	p= 511	p= 147	p= 506	p= 001	p= 649	p= 066	p= 647	p= 025	p= 041	p= 493	p= 096	p= 000	p= 328	p= 122	p= 183	p= 169
Teste Hiposmótico (C, Viáveis)	-,3598	-,5113	-,2243	-,4196	-,1627	-,3664	-,3491	-,3999	-,3664	-,3721	-,3398	-,2321	-,0363	-,4303	-,2448	-,2640	-,6904	-,5319	-,3829	-,3601	,0946	,2640
Fluorescência (C, Verde)	p= 188	p= 051	p= 422	p= 119	p= 562	p= 179	p= 179	p= 140	p= 202	p= 172	p= 215	p= 405	p= 898	p= 109	p= 379	p= 342	p= 004	p= 041	p= 159	p= 187	p= 737	p= 342
Normais	-,0407	-,0021	,0841	-,2374	,4209	-,0415	,0962	,0324	-,2677	,1711	,0379	,2438	,1050	-,0728	-,0615	-,1565	-,0855	,0627	,0999	,0943	,0943	-,3568
Defeitos Maiores	p= 886	p= 994	p= 766	p= 394	p= 118	p= 883	p= 733	p= 909	p= 335	p= 542	p= 893	p= 381	p= 710	p= 796	p= 828	p= 578	p= 304	p= 762	p= 824	p= 723	p= 738	p= 192
Defeitos menores	-,2108	-,2511	-,0598	-,4621	,3302	-,2257	,2452	-,1188	-,2651	,2928	,1055	,2261	,2491	-,0821	-,0849	-,4141	-,1537	-,1162	-,1976	-,0003	,0940	-,2828
Fertilidade (%)	p= 451	p= 367	p= 832	p= 083	p= 229	p= 419	p= 378	p= 673	p= 340	p= 290	p= 708	p= 418	p= 371	p= 771	p= 763	p= 125	p= 584	p= 680	p= 480	p= 999	p= 739	p= 307
Motilidade Total	-,2113	-,0816	-,1698	-,2587	-,1413	-,0601	,0212	-,1136	,3468	,0296	-,3708	-,0838	,5156	,1176	-,0023	-,2189	,2422	-,0770	-,2115	-,1315	-,2552	-,1863
Motilidade Progressiva	p= 450	p= 773	p= 545	p= 352	p= 615	p= 832	p= 940	p= 687	p= 205	p= 917	p= 174	p= 766	p= 049	p= 676	p= 993	p= 433	p= 384	p= 785	p= 449	p= 640	p= 359	p= 506
Motilidade Circular	,7010	,4789	,1538	,2436	,2417	,2471	-,2787	,6680	,1511	-,1780	-,3342	,5036	-,2076	-,3534	-,2992	,0338	-,0196	-,0479	,5048	,3205	-,2400	-,2601
Motilidade Rápidos	p= 004	p= 071	p= 584	p= 382	p= 386	p= 375	p= 314	p= 006	p= 591	p= 526	p= 223	p= 056	p= 458	p= 196	p= 279	p= 905	p= 945	p= 865	p= 055	p= 244	p= 389	p= 349
Motilidade Lentos	-,2353	-,2200	,0636	-,4015	-,0201	-,0994	,1475	-,3076	-,4195	,0795	,5561	-,2354	-,3660	,1047	,1868	-,1865	-,2459	,1024	-,1123	-,0778	,3919	,3394
Motilidade Local	p= 399	p= 431	p= 822	p= 138	p= 943	p= 724	p= 600	p= 265	p= 120	p= 778	p= 031	p= 398	p= 180	p= 710	p= 505	p= 506	p= 377	p= 717	p= 690	p= 783	p= 149	p= 216
Motilidade Circular	-,0187	-,1775	-,3359	,0538	,0431	-,1922	-,2511	,2357	,3617	,1724	-,3979	,2747	,4456	,2574	,1860	,3518	,3126	,1382	,1482	,2222	-,4708	,3616
Motilidade Progressiva	p= 947	p= 527	p= 221	p= 849	p= 879	p= 492	p= 367	p= 398	p= 185	p= 539	p= 142	p= 322	p= 096	p= 354	p= 507	p= 257	p= 623	p= 598	p= 426	p= 077	p= 185	p= 185
Motilidade Rápidos	-,1140	-,1321	-,0942	-,4178	,2137	-,2097	,2074	,0423	,2413	,2455	-,1130	,2956	,1583	-,1522	-,0855	-,1940	-,0537	-,2310	-,0482	,2324	,0668	-,2230
Motilidade Lentos	p= 686	p= 639	p= 738	p= 121	p= 444	p= 453	p= 458	p= 881	p= 386	p= 378	p= 688	p= 285	p= 573	p= 588	p= 762	p= 388	p= 849	p= 407	p= 865	p= 405	p= 813	p= 813
Motilidade Rápidos	-,0721	-,0022	-,1889	-,0355	,2404	-,0898	-,1636	,1373	,5708	,3923	-,1275	,2743	,3575	,0781	,0639	,1013	,4043	,1963	,0032	,2110	,0473	-,3070
Motilidade Circular	p= 798	p= 994	p= 500	p= 900	p= 388	p= 750	p= 560	p= 626	p= 026	p= 148	p= 651	p= 323	p= 191	p= 782	p= 821	p= 719	p= 135	p= 483	p= 991	p= 450	p= 867	p= 266
Motilidade Rápidos	-,0778	-,1848	-,2283	-,0732	,4036	-,1490	-,1631	,0215	-,0436	,2911	,2677	-,0120	,0740	,5152	,6594	-,1933	,0322	,3785	-,2167	-,0939	,3681	-,2472
Motilidade Lentos	p= 783	p= 510	p= 413	p= 796	p= 136	p= 596	p= 561	p= 939	p= 877	p= 292	p= 335	p= 966	p= 793	p= 049	p= 007	p= 490	p= 909	p= 164	p= 438	p= 739	p= 177	p= 375
Motilidade Local	,0032	,1002	-,0483	,2162	-,0852	,0579	,0748	,1068	,7686	,0150	-,0864	,0863	,0212	-,1324	-,1448	,2094	,3130	-,0591	,0910	,2113	,1147	-,1536
Motilidade Local	p= 991	p= 722	p= 864	p= 439	p= 763	p= 838	p= 791	p= 705	p= 001	p= 958	p= 760	p= 760	p= 940	p= 638	p= 607	p= 454	p= 256	p= 834	p= 747	p= 450	p= 684	p= 585
Motilidade Local	-,0777	-,0430	-,1672	-,2136	,3031	-,1344	-,2596	,1030	-,1807	,4714	-,1760	,3197	,4786	,0795	,0333	,0110	,3137	-,0190	,1494	-,1311	-,2536	-,3884
Motilidade Local	p= 783	p= 879	p= 551	p= 445	p= 272	p= 633	p= 350	p= 715	p= 519	p= 076	p= 530	p= 245	p= 071	p= 778	p= 906	p= 969	p= 255	p= 409	p= 946	p= 595	p= 641	p= 062
Motilidade Local	-,0765	-,1422	,0634	-,4587	,0407	-,1678	,4063	-,0781	-,2547	-,0785	-,2428	,1033	-,1505	-,2435	-,1568	,3594	-,4551	-,4568	-,0476	,0793	,0374	-,3884
Motilidade Local	p= 786	p= 613	p= 822	p= 085	p= 886	p= 550	p= 133	p= 782	p= 360	p= 781	p= 383	p= 714	p= 592	p= 382	p= 577	p= 188	p= 088	p= 087	p= 866	p= 779	p= 895	p= 754
Motilidade Local	,1028	,1341	,0986	,4565	-,2469	,2154	-,2011	-,0660	-,2520	-,3393	-,1106	-,3556	-,2031	,1411	,0959	,2349	-,0515	,1722	,0481	-,2791	-,0535	-,3191
Motilidade Local	p= 716	p= 634	p= 727	p= 087	p= 375	p= 441	p= 472	p= 815	p= 365	p= 216	p= 695	p= 193	p= 468	p= 616	p= 734	p= 399	p= 855	p= 539	p= 865	p= 314	p= 850	p= 246
Motilidade Local	-,0221	-,0216	-,2085	-,0496	,2297	-,1494	,0689	,1656	,4532	,0730	-,1018	,3081	,3658	-,2184	-,1923	-,1016	,0697	-,1718	-,0008	,1856	,0082	-,3402
Motilidade Local	p= 938	p= 939	p= 456	p= 861	p= 410	p= 595	p= 807	p= 555	p= 090	p= 796	p= 718	p= 267	p= 180	p= 434	p= 492	p= 719	p= 805	p= 540	p= 998	p= 508	p= 977	p= 215
Motilidade Local	,0020	,0829	-,1891	,0709	,2268	-,0609	-,1292	,2033	,4955	,1138	-,0712	,2759	,3670	-,0647	,0487	,2162	,1651	-,0050	,1126	,2444	-,0051	-,1567
Motilidade Local	p= 994	p= 769	p= 500	p= 802	p= 416	p= 829	p= 646	p= 467	p= 060	p= 686	p= 801	p= 320	p= 178	p= 819	p= 863	p= 439	p= 557	p= 986	p= 689	p= 380	p= 986	p= 577
Motilidade Local	-,0148	,0424	-,1896	,0458	,2080	-,0838	-,0532	,1762	,4901	,0730	-,0697	,2609	,3564	-,1163	-,0911	,0969	,1090	-,0861	,0666	,2105	,0093	-,2169
Motilidade Local	p= 958	p= 881	p= 499	p= 871	p= 457	p= 767	p= 851	p= 530	p= 064	p= 796	p= 805	p= 348	p= 192	p= 680	p= 747	p= 731	p= 699	p= 760	p= 814	p= 451	p= 974	p= 437
Motilidade Local	,1409	,2769	,1170	,4821	-,1406	,3206	-,5212	,0750	-,1154	-,0052	,0162	-,2133	,0561	,5031	,4344	,6366	,2605	,4147	,2274	,0382	-,2174	,5253
Motilidade Local	p= 616	p= 318	p= 678	p= 069	p= 617	p= 244	p= 046	p= 791	p= 682	p= 985	p= 954	p= 445	p= 843	p= 056	p= 106	p= 011	p= 348	p= 124	p= 415	p= 893	p= 436	p= 044
Motilidade Local	-,1133	-,0135	-,1011	-,2210	,1681	-,1380	,1062	,0801	,4791	,3604	-,0570	,2797	,1513	-,0184	-,0180	,0856	,2309	-,0036	,0429	,3069	,0146	-,2567
Motilidade Local	p= 688	p= 962	p= 720	p= 429	p= 549	p= 624	p= 706	p= 777	p= 071	p= 187	p= 840	p= 313	p= 590	p= 948	p= 949	p= 762	p= 408	p= 990	p= 879	p= 266	p= 959	p= 356
Motilidade Local	-,0728	-,1081	-,2403	-,1099	,1689	-,2098	,1331	,0993	,4260	,0226	-,1492	,2730	,3997	-,3030	-,2770	-,2928	,0114	-,2718	-,1013	,0848	-,0175	-,3862
Motilidade Local	p= 796	p= 701	p= 388	p= 697	p= 547	p= 453	p= 636	p= 725	p= 113	p= 936	p= 596	p= 325	p= 140	p= 272	p= 318	p= 290	p= 968	p= 327	p= 720	p= 764	p= 951	p= 155
Motilidade Local	-,1354	-,2136	-,2481	-,1947	-,2146	-,2093	,2177	-,2363	-,0412	-,4541	-,2630	-,4167	-,2447	-,3357	-,2934	-,0451	-,2288	,0035	-,2807	-,4844	-,1741	-,0002
Motilidade Local	p= 630	p= 445	p= 373	p= 487	p= 443	p= 454	p= 436	p= 396	p= 884	p= 089	p= 344	p= 122	p= 379	p= 221	p= 288	p= 873	p= 412	p= 990	p= 311	p= 067	p= 535	p= 999
Motilidade Local	,5876	,6593	-,5026	-,3368	-,4675	,5929	,5107	-,5865	,2351	-,3640	-,1277	-,4495	-,0776	-,4913	-,4186	-,5285	-,2580	-,3419	-,7017	-,6854	,2815	,0786
Motilidade Local	p= 021	p= 008	p= 056	p= 220	p= 079	p= 020	p= 052	p= 022	p= 399	p= 182	p= 650	p= 093	p= 783	p= 063	p= 120	p= 043	p= 353	p= 212	p= 004	p= 005	p= 309	p= 781
Motilidade Local	-,4712	-,3031	-,5551	-,1170	-,0105	-,4675	-,0669	-,2733	-,0396	,0035	-,0262	-,2720	,4510	-,3886	,4330	,1127	-,1185	,1361	-,3507	-,2677	-,0671	-,3814
Motilidade Local	p= 076	p= 272	p= 032	p= 678	p= 970	p= 079	p= 813	p= 324	p													

Variable	83	84	85	86	88	89	90	99	100	101	104	107	123	127	128	130	131	132	133	134	135	[[PROTEINAmg/ml	
101	p=537 -.0541 p=848	p=748 -.0210 p=941	p=214 .0616 p=827	p=851 -.4436 p=098	p=322 .5132 p=045	p=343 -.0252 p=929	p=576 -.1985 p=478	p=975 .1932 p=490	p=---	p=669 .1205 p=---	p=336 1,0000 p=166	p=799 .3767 p=066	p=930 -.4870 p=675	p=632 .1180 p=071	p=595 .4328 p=107	p=827 .0635 p=822	p=053 .7648 p=001	p=983 .6646 p=007	p=649 .0405 p=886	p=750 .4465 p=095	p=859 .3139 p=255	p=993 -.2000 p=475	
104	p=887 -.0887 p=753	p=2229 -.4125 p=425	p=126 .1915 p=126	p=091 -.1021 p=091	p=775 .7476 p=875	p=364 -.2217 p=814	p=814 -.2008 p=411	p=411 .8524 p=411	p=336 .0720 p=166	p=---	p=669 4,870 p=---	p=799 1,0000 p=---	p=930 -.1674 p=823	p=632 -.1300 p=---	p=595 .0943 p=---	p=827 .4716 p=617	p=053 .7648 p=001	p=983 .6646 p=007	p=649 .0405 p=886	p=750 .4465 p=095	p=859 .3139 p=255	p=993 -.2000 p=475	
107	p=7205 -.0022 p=002	p=5320 -.0411 p=041	p=1915 -.0235 p=494	p=126 -.0555 p=494	p=126 .0057 p=717	p=091 -.0057 p=001	p=814 -.0718 p=427	p=411 -.3224 p=473	p=336 .0539 p=000	p=---	p=669 .0250 p=799	p=799 1,180 p=066	p=930 -.2196 p=823	p=632 .1674 p=---	p=595 1,0000 p=---	p=827 -.0209 p=617	p=053 .7648 p=001	p=983 .6646 p=007	p=649 .0405 p=886	p=750 .4465 p=095	p=859 .3139 p=255	p=993 -.2000 p=475	
123	p=0829 -.0829 p=769	p=0235 -.2182 p=934	p=2182 -.0555 p=435	p=0555 -.0057 p=844	p=0057 -.0057 p=717	p=001 -.0057 p=001	p=427 -.0718 p=799	p=473 -.3224 p=241	p=000 .0539 p=849	p=---	p=669 .0250 p=930	p=799 1,180 p=066	p=930 -.2196 p=823	p=632 .1674 p=---	p=595 1,0000 p=---	p=827 -.0209 p=617	p=053 .7648 p=001	p=983 .6646 p=007	p=649 .0405 p=886	p=750 .4465 p=095	p=859 .3139 p=255	p=993 -.2000 p=475	
127	p=0608 -.0608 p=830	p=1466 -.1466 p=602	p=1049 .2265 p=710	p=2265 -.2350 p=417	p=2350 .2188 p=399	p=2188 -.4264 p=433	p=2188 -.0153 p=433	p=2188 -.1349 p=957	p=2188 .4785 p=632	p=2188 -.2046 p=071	p=2188 1,300 p=464	p=2188 -.0209 p=941	p=2188 1,0000 p=---	p=2188 .9531 p=---	p=2188 .3384 p=000	p=2188 .3443 p=217	p=2188 .7084 p=209	p=2188 .0686 p=003	p=2188 .0287 p=814	p=2188 .2122 p=919	p=2188 .1540 p=448	p=2188 1,540 p=584	
128	p=1258 -.1258 p=655	p=0018 -.0018 p=995	p=0190 .0190 p=946	p=0868 -.0868 p=946	p=2265 .2265 p=417	p=0986 -.0986 p=727	p=0986 -.3615 p=186	p=0986 -.0890 p=752	p=0986 -.1495 p=595	p=0986 .4328 p=107	p=0986 .3100 p=261	p=0986 -.1970 p=482	p=0986 -.1578 p=574	p=0986 .9531 p=000	p=0986 1,0000 p=---	p=0986 .2171 p=437	p=0986 .1994 p=476	p=0986 .6608 p=007	p=0986 -.0550 p=846	p=0986 -.0815 p=773	p=0986 .3452 p=208	p=0986 1,282 p=649	
130	p=1974 -.1974 p=481	p=5097 -.5097 p=052	p=1174 .1174 p=677	p=4844 -.4844 p=067	p=1328 .1328 p=637	p=3187 -.3187 p=247	p=4907 -.4907 p=063	p=2692 .2692 p=332	p=0618 -.0618 p=827	p=0635 -.0635 p=827	p=1407 -.1407 p=617	p=0943 -.0943 p=738	p=0808 .3384 p=775	p=0808 .2171 p=217	p=0808 .2171 p=---	p=0808 1,0000 p=---	p=0808 .2622 p=345	p=0808 .4412 p=100	p=0808 .5154 p=049	p=0808 .3047 p=270	p=0808 -.1750 p=533	p=0808 4,657 p=080	
131	p=1467 -.1467 p=602	p=1610 -.1610 p=566	p=0552 -.0552 p=845	p=0855 -.0855 p=762	p=2610 .2610 p=347	p>0457 -.0457 p=871	p>1879 -.1879 p=503	p>3211 -.3211 p=243	p>5084 -.5084 p=053	p>7648 -.7648 p=001	p>0086 -.0086 p=976	p>4716 -.4716 p=076	p>2634 -.2634 p=343	p>3443 -.3443 p=209	p>1994 -.1994 p=476	p>2622 -.2622 p=345	p>10000 -.10000 p=---	p>5944 -.5944 p=019	p>1398 -.1398 p=619	p>5023 -.5023 p=056	p>0239 -.0239 p=933	p>0354 -.0354 p=900	
132	p=1109 -.1109 p=694	p=1790 -.1790 p=523	p=1277 -.1277 p=650	p=0502 -.0502 p=859	p>6013 -.6013 p=018	p>0021 -.0021 p=994	p>3545 -.3545 p=195	p>2593 -.2593 p=351	p>0059 -.0059 p=983	p>6646 -.6646 p=007	p>0202 -.0202 p=943	p>2463 -.2463 p=376	p>0717 -.0717 p=800	p>7084 -.7084 p=003	p>6608 -.6608 p=007	p>4412 -.4412 p=100	p>5944 -.5944 p=019	p>10000 -.10000 p=---	p>1318 -.1318 p=640	p>1813 -.1813 p=518	p>3802 -.3802 p=162	p>0054 -.0054 p=985	
133	p=8909 -.8909 p=000	p>9722 -.9722 p=000	p>6695 -.6695 p=006	p>4975 -.4975 p=059	p>4518 -.4518 p=091	p>7666 -.7666 p=001	p>5491 -.5491 p=034	p>8349 -.8349 p=000	p>1282 -.1282 p=649	p>0405 -.0405 p=777	p>0799 -.0799 p=876	p>6064 -.6064 p=017	p>0440 -.0440 p=876	p>0666 -.0666 p=814	p>0550 -.0550 p=846	p>5154 -.5154 p=049	p>1398 -.1398 p=619	p>1318 -.1318 p=640	p>10000 -.10000 p=---	p>7867 -.7867 p=001	p>2920 -.2920 p=291	p>2798 -.2798 p=313	
134	p=7715 -.7715 p=001	p>7163 -.7163 p=003	p>4788 -.4788 p=071	p>0352 -.0352 p=901	p>5205 -.5205 p=047	p>4927 -.4927 p=062	p>2912 -.2912 p=292	p>8205 -.8205 p=000	p>0901 -.0901 p=750	p>4465 -.4465 p=095	p>1254 -.1254 p=656	p>8107 -.8107 p=000	p>1123 -.1123 p=690	p>0287 -.0287 p=919	p>0815 -.0815 p=773	p>3047 -.3047 p=270	p>5023 -.5023 p=056	p>1813 -.1813 p=518	p>7867 -.7867 p=001	p>10000 -.10000 p=---	p>2064 -.2064 p=461	p>3878 -.3878 p=153	
135	p=2523 -.2523 p=364	p>3235 -.3235 p=240	p>0332 -.0332 p=906	p>3611 -.3611 p=186	p>2464 -.2464 p=376	p>1495 -.1495 p=595	p>2549 -.2549 p=359	p>2602 -.2602 p=349	p>0503 -.0503 p=859	p>3139 -.3139 p=255	p>5347 -.5347 p=040	p>638 -.638 p=015	p>448 -.448 p=448	p>2122 -.2122 p=448	p>3452 -.3452 p=208	p>1750 -.1750 p=533	p>0239 -.0239 p=933	p>3802 -.3802 p=162	p>2920 -.2920 p=291	p>2084 -.2084 p=461	p>10000 -.10000 p=---	p>2635 -.2635 p=343	
[[PROTEINAmg/ml	p=4829 -.4829 p=068	p>2836 -.2836 p=306	p>3472 -.3472 p=205	p>0921 -.0921 p=744	p>4710 -.4710 p=076	p>2391 -.2391 p=391	p>0628 -.0628 p=824	p>4351 -.4351 p=105	p>0025 -.0025 p=993	p>2000 -.2000 p=475	p>0659 -.0659 p=816	p>0410 -.0410 p=128	p>3279 -.3279 p=440	p>0742 -.0742 p=584	p>0912 -.0912 p=649	p>1697 -.1697 p=080	p>1042 -.1042 p=900	p>0354 -.0354 p=985	p>0054 -.0054 p=313	p>2798 -.2798 p=153	p>3878 -.3878 p=153	p>2635 -.2635 p=343	p>10000 -.10000 p=---
VOLUME TOTAL DO EJACULADO	p=2156 -.2156 p=440	p>0996 -.0996 p=724	p>2905 -.2905 p=283	p>1906 -.1906 p=496	p>1244 -.1244 p=659	p>3279 -.3279 p=233	p>4260 -.4260 p=113	p>0236 -.0236 p=333	p>5591 -.5591 p=030	p>2068 -.2068 p=460	p>2248 -.2248 p=421	p>1680 -.1680 p=549	p>0742 -.0742 p=793	p>0912 -.0912 p=747	p>1697 -.1697 p=545	p>1042 -.1042 p=712	p>0391 -.0391 p=147	p>0344 -.0344 p=903	p>1057 -.1057 p=708	p>1937 -.1937 p=489	p>0860 -.0860 p=761	p>2123 -.2123 p=448	
Total de Proteínas/ Ejaculado	p=3538 -.3538 p=196	p>1883 -.1883 p=502	p>3752 -.3752 p=168	p>1042 -.1042 p=712	p>2912 -.2912 p=292	p>3536 -.3536 p=196	p>3178 -.3178 p=248	p>1845 -.1845 p=510	p>4651 -.4651 p=109	p>2228 -.2228 p=818	p>0549 -.0549 p=425	p>1313 -.1313 p=971	p>0393 -.0393 p=641	p>747 -.747 p=889	p>545 -.545 p=691	p>712 -.712 p=288	p>147 -.147 p=300	p>903 -.903 p=877	p>708 -.708 p=513	p>489 -.489 p=977	p>761 -.761 p=478	p>448 -.448 p=013	
TRIPTOFANO	p=1616 -.1616 p=565	p>0544 -.0544 p=847	p>0929 -.0929 p=742	p>2695 -.2695 p=331	p>0128 -.0128 p=788	p>0128 -.0128 p=964	p>0128 -.0128 p=608	p>0128 -.0128 p=560	p>0128 -.0128 p=497	p>0128 -.0128 p=642	p>0128 -.0128 p=034	p>0128 -.0128 p=525	p>0128 -.0128 p=329	p>0128 -.0128 p=356	p>0128 -.0128 p=159	p>0128 -.0128 p=143	p>0128 -.0128 p=395	p>0128 -.0128 p=582	p>0128 -.0128 p=808	p>0128 -.0128 p=787	p>0128 -.0128 p=193	p>0128 -.0128 p=504	
FRUTOSE	p=0135 -.0135 p=962	p>0261 -.0261 p=926	p>2365 -.2365 p=396	p>0449 -.0449 p=874	p>4426 -.4426 p=098	p>1507 -.1507 p=592	p>2388 -.2388 p=391	p>1020 -.1020 p=717	p>1300 -.1300 p=644	p>1824 -.1824 p=515	p>2303 -.2303 p=409	p>0147 -.0147 p=959	p>1292 -.1292 p=646	p>3925 -.3925 p=148	p>5159 -.5159 p=049	p>4595 -.4595 p=085	p>0392 -.0392 p=890	p>5522 -.5522 p=033	p>0609 -.0609 p=829	p>0466 -.0466 p=889	p>3986 -.3986 p=141	p>0625 -.0625 p=825	
ÁCIDO LÁCTICO	p=0984 -.0984 p=727	p>0947 -.0947 p=737	p>3068 -.3068 p=266	p>3136 -.3136 p=255	p>0116 -.0116 p=967	p>2203 -.2203 p=430	p>2546 -.2546 p=360	p>0643 -.0643 p=820	p>3838 -.3838 p=158	p>3066 -.3066 p=266	p>6883 -.6883 p=005	p>0833 -.0833 p=768	p>0712 -.0712 p=801	p>1844 -.1844 p=511	p>2485 -.2485 p=372	p>0179 -.0179 p=949	p>1111 -.1111 p=693	p>1835 -.1835 p=513	p>0021 -.0021 p=994	p>1588 -.1588 p=572	p>1898 -.1898 p=498	p>0471 -.0471 p=868	
ORNITINA	p=2858 -.2858 p=302	p>1347 -.1347 p=632	p>2715 -.2715 p=328	p>2813 -.2813 p=310	p>4495 -.4495 p=093	p>1816 -.1816 p=517	p>0462 -.0462 p=870	p>3036 -.3036 p=271	p>1075 -.1075 p=703	p>6539 -.6539 p=008	p>3126 -.3126 p=257	p>4598 -.4598 p=085	p>0529 -.0529 p=851	p>3006 -.3006 p=276	p>2731 -.2731 p=325	p>1731 -.1731 p=537	p>4290 -.4290 p=111	p>3340 -.3340 p=224	p>1743 -.1743 p=534	p>1642 -.1642 p=084	p>3012 -.3012 p=559		
MELATONINA	p=1971 -.1971 p=481	p>1074 -.1074 p=703	p>0171 -.0171 p=952	p>4745 -.4745 p=074	p>2965 -.2965 p=283	p>1302 -.1302 p=644	p>3324 -.3324 p=226	p>2301 -.2301 p=409	p>2815 -.2815 p=310	p>3856 -.3856 p=156	p>1737 -.1737 p=536	p>4333 -.4333 p=107	p>2655 -.2655 p=339	p>1865 -.1865 p=506	p>1260 -.1260 p=655	p>6830 -.6830 p=005	p>2994 -.2994 p=278	p>0270 -.0270 p=924	p>0970 -.0970 p=731	p>2267 -.2267 p=417	p>4298 -.4298 p=110	p>6876 -.6876 p=005	
Acetil Carnitina	p=0809 -.0809 p=774	p>3053 -.3053 p=268	p>3916 -.3916 p=149	p>4626 -.4626 p=082	p>0810 -.0810 p=774	p>4261 -.4261 p=113	p>2340 -.2340 p=401	p>0491 -.0491 p=862	p>6231 -.6231 p=013	p>2523 -.2523 p=364	p>1575 -.1575 p=575	p>2801 -.2801 p=312	p>0462 -.0462 p=870	p>3828 -.3828 p=159	p>3431 -.3431 p=211	p>3710 -.3710 p=173	p>4450 -.4450 p=097	p>0233 -.0233 p=934	p>2878 -.2878 p=298	p>0294 -.0294 p=917	p>0735 -.0735 p=795	p>1892 -.1892 p=500	
Carnitina	p=3677 -.3677 p=178	p>0989 -.0989 p=726	p>0709 -.0709 p=802	p>0821 -.0821 p=771	p>0245 -.0245 p=931	p>0476 -.0476 p=866	p>0413 -.0413 p=884	p>3131 -.3131 p=256	p>2351 -.2351 p=399	p>3122 -.3122 p=252	p>3158 -.3158 p=629	p>1360 -.1360 p=315	p>2785 -.2785 p=199	p>3512 -.3512 p=390	p>2397 -.2397 p=083	p>4615 -.4615 p=683	p>1152 -.1152 p=469	p>2024 -.2024 p=868	p>0470 -.0470 p=849	p>0539 -.0			

Variable	VOLUME TOTAL DO EJACULADO	Total de Proteínas/ Ejaculado	TRIPTOFANO	FRUTOSE	ÁCIDO LÁTICO	ORNITINA	MELATONINA	Acetil Carnitina	Carnitina	Fenilalanina	Isoleucina_Leucina	Methylbutanoyl Carnitina
IDADE	-,0469 p=,868	-,2084 p=,456	,2009 p=,473	,4210 p=,118	,1345 p=,633	,4622 p=,083	-,2534 p=,362	,0538 p=,849	,3020 p=,274	,2357 p=,398	,2523 p=,364	,4549 p=,088
Concentração (milhões/ml)	-,1036 p=,713	,0512 p=,856	,4182 p=,121	,1761 p=,530	,0525 p=,853	-,2658 p=,338	-,1836 p=,513	,1710 p=,542	-,2688 p=,548	-,2764 p=,295	-,3179 p=,312	-,3256 p=,236
Teste Hiposmótico (C. Viáveis)	,1453 p=,605	-,0423 p=,881	,2754 p=,321	,1242 p=,659	-,3559 p=,193	-,2361 p=,397	-,0560 p=,843	-,2984 p=,280	-,3431 p=,211	-,3099 p=,261	-,0472 p=,867	,0976 p=,729
Fluorescência (C. Verde)	,2098 p=,453	,0392 p=,890	,0611 p=,829	-,0977 p=,729	-,2820 p=,309	-,3400 p=,215	-,2461 p=,377	-,0978 p=,729	-,3340 p=,224	-,0388 p=,891	-,1879 p=,503	-,0340 p=,904
Normais	-,0011 p=,997	-,1149 p=,683	-,5524 p=,033	-,3384 p=,217	-,3545 p=,195	-,2645 p=,341	-,1115 p=,692	-,2622 p=,345	,0597 p=,833	-,3951 p=,145	-,7283 p=,002	-,2441 p=,381
Defeitos Maiores	-,1746 p=,534	-,2006 p=,473	-,3175 p=,249	-,1148 p=,684	-,0930 p=,742	,0084 p=,976	-,2337 p=,402	-,3266 p=,235	-,7660 p=,001	-,2527 p=,363	-,0363 p=,898	-,2825 p=,308
Defeitos menores	,1087 p=,700	,2336 p=,402	,7250 p=,002	,3929 p=,147	,3933 p=,147	,2443 p=,380	,2500 p=,369	,4470 p=,095	,4102 p=,129	,5332 p=,041	,7161 p=,003	,4066 p=,133
Fertilidade (%)	,3597 p=,188	,4461 p=,096	,0055 p=,984	,0497 p=,861	-,4223 p=,117	-,1054 p=,708	,2078 p=,457	-,1553 p=,581	,1926 p=,492	-,0980 p=,728	-,2105 p=,452	,0728 p=,796
Motilidade Total	,3999 p=,140	,1585 p=,573	,2901 p=,294	,1015 p=,719	-,3623 p=,184	,2129 p=,446	-,2496 p=,370	-,0616 p=,827	,1904 p=,497	,3039 p=,271	-,0258 p=,927	-,1823 p=,516
Motilidade Progressiva	,1748 p=,533	-,0225 p=,937	,0264 p=,926	,2269 p=,416	-,2749 p=,321	-,0597 p=,833	-,1402 p=,618	-,3236 p=,239	,1429 p=,611	,3030 p=,272	-,2127 p=,447	-,0853 p=,762
Motilidade Circular	-,2389 p=,391	-,3392 p=,216	,2241 p=,422	-,5804 p=,023	,1243 p=,659	,2018 p=,471	-,1684 p=,549	,1165 p=,679	-,0602 p=,831	,2653 p=,339	-,1809 p=,519	-,1456 p=,605
Motilidade Rápidos	,4503 p=,092	,2743 p=,322	,0199 p=,944	,1013 p=,719	-,3469 p=,205	-,0444 p=,875	-,0769 p=,785	-,1723 p=,539	-,0785 p=,781	,3133 p=,256	-,0684 p=,809	-,1751 p=,533
Motilidade Lentos	-,0841 p=,766	-,1925 p=,492	-,0496 p=,861	,0841 p=,766	-,1066 p=,705	-,1026 p=,716	-,0966 p=,732	-,3617 p=,185	,2686 p=,333	,0921 p=,744	-,2956 p=,283	-,0610 p=,829
Motilidade Local	,3383 p=,218	,2418 p=,385	,3359 p=,221	-,0916 p=,745	-,2185 p=,434	,3060 p=,267	-,1507 p=,592	,2538 p=,361	,0864 p=,652	,1721 p=,759	-,0588 p=,540	-,1117 p=,646
Imoveis	-,4998 p=,058	-,2460 p=,377	-,2477 p=,373	-,0612 p=,828	,3546 p=,195	-,3534 p=,196	,2803 p=,312	,0735 p=,795	-,1914 p=,494	-,2700 p=,330	,0588 p=,835	-,1117 p=,692
Velocidade (VCL) [µm/s]	,2156 p=,440	,0050 p=,986	,1502 p=,985	-,4475 p=,593	-,1196 p=,094	-,1196 p=,671	-,2063 p=,492	,0463 p=,461	,2566 p=,870	-,1942 p=,356	-,4141 p=,488	-,1255 p=,125
Velocidade (VSL) [µm/s]	,1982 p=,479	,0696 p=,805	,1882 p=,502	,3564 p=,192	-,3548 p=,194	-,1854 p=,508	-,0342 p=,904	-,1130 p=,688	,1675 p=,551	,4543 p=,089	,0009 p=,997	-,2325 p=,404
Velocidade (VAP)	,2273 p=,415	,0654 p=,817	,1371 p=,626	,2886 p=,297	-,4048 p=,135	-,1441 p=,608	-,0377 p=,894	-,1107 p=,694	,1086 p=,700	,3981 p=,142	-,0565 p=,841	-,3091 p=,262
Linearidade	-,2466 p=,376	,0291 p=,918	,1042 p=,712	-,2581 p=,353	,4331 p=,107	-,1122 p=,690	-,5573 p=,031	,2680 p=,334	,1141 p=,686	,0457 p=,871	-,2973 p=,282	-,4568 p=,087
BCF [Hz]	,4725 p=,075	,2481 p=,373	,2674 p=,335	-,1594 p=,570	-,3745 p=,169	-,0984 p=,727	-,0975 p=,730	-,1467 p=,602	,3024 p=,273	,3761 p=,167	-,0657 p=,816	-,0822 p=,771
ALH [µm]	-,1963 p=,483	-,0293 p=,918	-,1475 p=,600	-,0174 p=,951	-,4942 p=,061	-,1101 p=,696	-,2993 p=,278	-,2840 p=,305	-,0553 p=,845	,0858 p=,761	-,3569 p=,192	-,5294 p=,042
71	-,3062 p=,267	-,2445 p=,380	-,2267 p=,417	,0637 p=,822	,1281 p=,649	-,4039 p=,135	,1017 p=,718	-,0998 p=,723	-,3422 p=,212	-,0209 p=,941	-,0384 p=,892	-,0036 p=,990
72	,0217 p=,939	,0451 p=,873	-,3141 p=,254	-,3066 p=,266	-,1794 p=,163	-,3791 p=,317	-,2772 p=,317	-,4580 p=,086	-,2858 p=,302	-,2302 p=,409	-,4105 p=,129	-,5139 p=,050
77	,0810 p=,774	,1835 p=,513	,3669 p=,179	,4915 p=,063	-,1310 p=,642	-,1737 p=,536	,3715 p=,173	,2568 p=,355	,3998 p=,140	,2769 p=,318	,1059 p=,707	,0817 p=,772
78	-,1903 p=,497	-,2665 p=,337	,0018 p=,995	,2078 p=,457	-,2741 p=,323	-,1259 p=,655	-,0499 p=,860	,1296 p=,645	-,4343 p=,106	,1315 p=,640	-,2674 p=,335	-,3054 p=,268
83	-,2156 p=,440	-,3538 p=,196	-,1616 p=,565	-,0135 p=,962	,0984 p=,727	,2858 p=,302	-,1971 p=,481	,0809 p=,774	-,3677 p=,178	-,1209 p=,668	,2250 p=,420	-,0039 p=,989
84	-,0996 p=,724	-,1883 p=,502	-,0544 p=,847	-,0261 p=,926	-,0947 p=,737	-,1347 p=,632	-,1074 p=,703	,3053 p=,268	-,0989 p=,726	-,0006 p=,998	,2356 p=,398	,2174 p=,436
85	-,2965 p=,283	-,3752 p=,168	,0929 p=,742	-,2365 p=,396	,3068 p=,266	,2715 p=,328	-,0171 p=,952	,3916 p=,149	,0709 p=,802	,0419 p=,882	-,2867 p=,300	-,1042 p=,712
86	-,1906 p=,496	-,1042 p=,712	-,2695 p=,331	-,0449 p=,874	-,3136 p=,255	-,2813 p=,310	-,4745 p=,074	,4626 p=,082	-,0821 p=,771	-,1391 p=,621	-,0832 p=,768	-,1440 p=,609
88	-,1244 p=,659	-,2912 p=,292	,0758 p=,788	,4426 p=,096	,0116 p=,967	,4495 p=,093	-,2965 p=,283	,0810 p=,774	,0245 p=,931	,2179 p=,435	-,2781 p=,316	-,1458 p=,604
89	-,3279 p=,233	-,3536 p=,196	,0128 p=,964	-,1507 p=,592	,2203 p=,430	,1816 p=,517	,4261 p=,644	,2023 p=,113	,0344 p=,866	,2439 p=,903	-,1292 p=,381	-,2929 p=,646
90	,4260 p=,113	,3178 p=,248	-,1444 p=,608	-,2388 p=,391	-,2546 p=,360	-,0462 p=,870	-,3324 p=,226	-,2340 p=,401	-,0413 p=,884	-,1837 p=,512	-,2196 p=,390	-,4322 p=,432
99	-,0236 p=,933	-,1845 p=,510	-,1635 p=,560	-,1020 p=,717	-,0643 p=,820	,3036 p=,271	-,2301 p=,409	-,0491 p=,862	-,0781 p=,256	-,1533 p=,782	-,0330 p=,586	-,0177 p=,950
100	-,5591	,4310	-,1904	-,1300	-,3838	-,1075	-,2815	-,6231	-,2351	-,0209	-,3497	-,2633

Variable	VOLUME TOTAL DO EJACULADO	Total de Proteínas/ Ejaculado	TRIPTOFANO	FRUTOSE	ÁCIDO LÁCTICO	ORNITINA	MELATONINA	Acetil Carnitina	Carnitina	Fenilalanina	Isoleucina_leucina	Methylbutanoyl Carnitina
101	p= .030 2068	p= .109 0651	p= .497 1307	p= .644 1824	p= .158 3066	p= .703 6539	p= .310 3856	p= .013 2523	p= .399 3122	p= .941 1605	p= .201 0731	p= .343 3210
104	p= .460 2248	p= .818 2228	p= .642 5496	p= .515 2303	p= .266 6883	p= .008 3126	p= .156 1737	p= .364 1575	p= .257 3158	p= .568 4365	p= .796 5629	p= .243 0788
107	p= .421 1680	p= .425 0103	p= .034 1784	p= .409 0147	p= .005 4598	p= .257 2801	p= .536 4333	p= .575 2801	p= .252 1360	p= .104 0760	p= .029 0085	p= .780 0682
123	p= .742 0742	p= .971 1313	p= .525 2710	p= .959 1292	p= .768 0712	p= .085 0529	p= .107 2655	p= .312 0462	p= .629 2785	p= .788 1727	p= .976 4019	p= .809 0046
127	p= .793 0912	p= .641 0393	p= .329 2566	p= .646 3925	p= .801 1844	p= .851 3006	p= .339 1865	p= .870 3828	p= .538 3512	p= .138 1511	p= .987 2280	p= .138 4782
128	p= .747 1697	p= .889 1121	p= .356 3831	p= .148 5159	p= .511 2485	p= .276 2731	p= .506 1260	p= .159 3431	p= .199 2397	p= .591 2427	p= .414 3360	p= .071 3627
130	p= .545 1042	p= .691 2934	p= .159 3967	p= .049 4595	p= .372 0179	p= .325 1731	p= .655 6830	p= .211 3710	p= .390 4615	p= .383 4888	p= .221 4454	p= .184 6035
131	p= .712 1042	p= .288 2934	p= .143 3967	p= .085 4595	p= .949 0179	p= .537 1731	p= .005 6830	p= .173 3710	p= .083 4615	p= .064 4888	p= .096 4454	p= .017 6035
132	p= .393 0344	p= .286 0437	p= .300 1545	p= .395 5522	p= .890 1835	p= .693 3340	p= .111 0270	p= .278 0233	p= .097 2024	p= .683 2645	p= .718 2561	p= .384 5275
133	p= .903 1057	p= .877 1836	p= .582 0685	p= .033 0609	p= .513 0021	p= .224 1743	p= .924 0970	p= .934 2878	p= .469 0470	p= .341 1070	p= .357 3452	p= .043 2052
134	p= .708 1937	p= .513 0083	p= .808 0762	p= .829 0466	p= .994 1588	p= .534 4612	p= .731 2267	p= .298 0294	p= .868 0539	p= .704 1014	p= .208 2725	p= .463 1722
135	p= .489 0860	p= .977 1985	p= .787 3555	p= .869 3986	p= .572 1898	p= .084 1642	p= .417 4298	p= .917 0735	p= .849 0480	p= .719 4564	p= .326 3744	p= .539 1200
[] PROTEÍNAmg/ml	p= .761 2123	p= .478 6230	p= .193 1871	p= .141 0625	p= .498 0471	p= .559 3012	p= .110 6876	p= .795 1892	p= .865 0854	p= .087 0486	p= .169 0410	p= .670 2416
VOLUME TOTAL DO EJACULADO	p= .448 10000	p= .013 8917	p= .504 0321	p= .825 1940	p= .868 5156	p= .275 3802	p= .005 0885	p= .500 1242	p= .156 1381	p= .863 0317	p= .885 2334	p= .386 1770
Total de Proteínas/ Ejaculado	p= --- 8917	p= .000 10000	p= .910 0345	p= .489 1553	p= .049 4523	p= .162 1709	p= .754 2277	p= .659 0283	p= .624 2590	p= .911 0286	p= .402 1773	p= .528 2328
TRIPTOFANO	p= .0321 0321	p= .0345 10000	p= .1000 7325	p= .580 3376	p= .580 0091	p= .580 3760	p= .580 4483	p= .580 4943	p= .580 8810	p= .580 4768	p= .580 321	p= .580 3681
FRUTOSE	p= .1940 489	p= .1553 7325	p= .1000 3376	p= .580 0091	p= .580 3760	p= .580 4483	p= .580 4943	p= .580 8810	p= .580 4768	p= .580 321	p= .580 3681	p= .580 3681
ÁCIDO LÁCTICO	p= .5156 049	p= .4523 091	p= .3012 6876	p= .3012 6876	p= .3012 6876	p= .3012 6876	p= .3012 6876	p= .3012 6876	p= .3012 6876	p= .3012 6876	p= .3012 6876	p= .3012 6876
ORNITINA	p= .3802 162	p= .1709 0091	p= .0580 1437	p= .610 10000	p= .610 1437	p= .610 10000	p= .610 1437	p= .610 10000	p= .610 1437	p= .610 10000	p= .610 1437	p= .610 10000
MELATONINA	p= .0885 754	p= .2277 3760	p= .3004 0139	p= .4258 961	p= .114 961	p= .114 961	p= .114 961	p= .114 961	p= .114 961	p= .114 961	p= .114 961	p= .114 961
Acetil Carnitina	p= .1242 659	p= .0283 4483	p= .3148 0180	p= .1067 0180	p= .6316 10000	p= .012 10000	p= .012 10000	p= .012 10000	p= .012 10000	p= .012 10000	p= .012 10000	p= .012 10000
Carnitina	p= .1381 624	p= .2590 4943	p= .0463 2710	p= .870 646	p= .059 646	p= .059 646	p= .059 646	p= .059 646	p= .059 646	p= .059 646	p= .059 646	p= .059 646
Fenilalanina	p= .0317 911	p= .0286 919	p= .8810 0000	p= .8053 0000	p= .4768 432	p= .3328 798	p= .225 798	p= .202 798	p= .072 798	p= .072 798	p= .072 798	p= .072 798
Isoleucina_leucina	p= .2334 402	p= .1773 527	p= .8652 0000	p= .7446 001	p= .3324 053	p= .2757 770	p= .2757 770	p= .2757 770	p= .2757 770	p= .2757 770	p= .2757 770	p= .2757 770
Methylbutanoyl Carnitina	p= .1770 528	p= .2326 3681	p= .3298 230	p= .5231 502	p= .5231 2694	p= .5231 2694	p= .5231 2694	p= .5231 2694	p= .5231 2694	p= .5231 2694	p= .5231 2694	p= .5231 2694
ACIDO CITRICO	p= .0006 998	p= .0673 812	p= .7441 001	p= .5307 057	p= .042 387	p= .042 387	p= .042 387	p= .042 387	p= .042 387	p= .042 387	p= .042 387	p= .042 387
ACIDO HIPURICO	p= .2682 334	p= .1344 633	p= .0423 881	p= .1543 583	p= .1151 683	p= .2058 361	p= .2541 361	p= .2418 361	p= .0451 873	p= .0059 983	p= .0909 747	p= .4519 091
1,3-DIOXAN-5-OL	p= .3942 146	p= .3587 189	p= .2263 417	p= .2018 471	p= .5985 018	p= .0156 956	p= .0242 932	p= .0741 793	p= .4370 103	p= .3045 270	p= .0074 979	p= .0829 769
ÁCIDO ESTEÁRICO	p= .1071 704	p= .1352 631	p= .2790 314	p= .1841 511	p= .2502 368	p= .0794 778	p= .5085 053	p= .5621 029	p= .3097 261	p= .2606 348	p= .3750 168	p= .6272 012
ÁCIDO FOSFÓRICO	p= .5941 020	p= .5182 048	p= .0608 830	p= .0239 933	p= .6965 004	p= .0652 817	p= .0589 835	p= .0869 758	p= .3808 161	p= .1105 695	p= .2559 357	p= .0339 905
ÁCIDO OLEICO	p= .1761 530	p= .2898 295	p= .2685 333	p= .0276 922	p= .1873 504	p= .0368 896	p= .2462 376	p= .0211 940	p= .1310 642	p= .1185 674	p= .2055 462	p= .0032 991
ÁCIDO PALMÍTICO	p= .0439 877	p= .0028 992	p= .8017 000	p= .5738 025	p= .3947 145	p= .0125 965	p= .5063 054	p= .5838 022	p= .6735 006	p= .6456 009	p= .6555 008	p= .4693 078
TAURINA	p= .2104 452	p= .2951 286	p= .7629 001	p= .7620 001	p= .2240 422	p= .0929 742	p= .4300 110	p= .3091 262	p= .3900 151	p= .6867 005	p= .6411 010	p= .4264 113

Variable	ACIDO CITRICO	ACIDO HIPURICO	1,3-DIOXAN-5-OL	ÁCIDO ESTEÁRICO	ÁCIDO FOSFÓRICO	ÁCIDO OLEICO	ÁCIDO PALMÍTICO	TAURINA
IDADE	-1,009 p= 721	-0,778 p= 783	-3,294 p= 231	,1739 p= 535	,2733 p= 324	,2018 p= 471	,1442 p= 608	,1453 p= 605
Concentração (milhões/ml)	,4726 p= 075	-3,754 p= 168	-,1693 p= 546	-,3319 p= 227	-,1138 p= 686	,0719 p= 799	,3700 p= 175	,2078 p= 457
Teste Hiposmótico (C, Viáveis)	,0366 p= 897	-,1085 p= 700	-,6047 p= 017	,0189 p= 947	-,6162 p= 014	,2905 p= 294	,2850 p= 303	,0593 p= 834
Fluorescência (C, Verde)	-,0280 p= 921	-,0917 p= 745	-,5714 p= 026	-,2520 p= 365	-,6306 p= 012	,3179 p= 248	-,1736 p= 536	-,0451 p= 873
Normais	-,6617 p= 007	-,1375 p= 625	-,1566 p= 577	-,0398 p= 888	-,3098 p= 261	,0584 p= 836	-,2239 p= 422	-,3881 p= 153
Defeitos Maiores	-,1149 p= 683	,0912 p= 747	,3149 p= 253	,0193 p= 946	-,2858 p= 302	-,1137 p= 687	-,5980 p= 019	-,2870 p= 300
Defeitos menores	,7020 p= 004	-,1850 p= 509	-,0451 p= 873	,0208 p= 941	-,1191 p= 672	,0128 p= 964	-,5801 p= 023	,5502 p= 034
Fertilidade (%)	-,1733 p= 537	,0701 p= 804	-,5102 p= 052	,0092 p= 974	-,6471 p= 009	-,5637 p= 029	,0608 p= 830	,3248 p= 238
Motilidade Total	,1545 p= 582	-,1790 p= 523	-,6043 p= 017	-,0916 p= 746	-,7157 p= 003	-,1075 p= 703	,2624 p= 345	,1956 p= 485
Motilidade Progressiva	-,1418 p= 614	-,2369 p= 395	-,4096 p= 129	-,0565 p= 841	-,5145 p= 050	-,1460 p= 604	-,0030 p= 992	-,1100 p= 696
Motilidade Circular	,1764 p= 529	-,1205 p= 669	-,1543 p= 583	-,1043 p= 711	,0751 p= 790	,0382 p= 893	,2290 p= 412	,3286 p= 232
Motilidade Rápidos	,0467 p= 869	,3424 p= 212	-,1911 p= 495	,1250 p= 657	,2437 p= 381	-,2306 p= 408	-,1066 p= 705	,0891 p= 752
Motilidade Lentos	-,2849 p= 303	,0885 p= 754	-,3461 p= 206	,0103 p= 971	,4763 p= 073	-,0245 p= 931	,0190 p= 947	-,0107 p= 970
Motilidade Local	,3075 p= 265	-,0270 p= 924	-,3994 p= 140	-,1727 p= 538	,4259 p= 113	,0087 p= 975	,3234 p= 240	,1374 p= 625
Imoveis	-,1805 p= 520	-,2078 p= 457	,5881 p= 021	,0977 p= 729	-,7206 p= 002	,1084 p= 701	-,2264 p= 417	-,2133 p= 445
Velocidade (VCL) [µm/s]	-,0273 p= 923	,0369 p= 896	-,5376 p= 039	-,1065 p= 706	-,6034 p= 017	-,0926 p= 743	,0212 p= 940	,0630 p= 823
Velocidade (VSL) [µm/s]	,1075 p= 703	,0904 p= 749	-,5252 p= 044	,0667 p= 813	-,5491 p= 034	-,2768 p= 318	,1470 p= 601	,2770 p= 318
Velocidade (VAP)	,0887 p= 753	,0931 p= 741	-,5297 p= 042	,0080 p= 978	-,5629 p= 029	-,2207 p= 429	,1119 p= 691	,2185 p= 434
Linearidade	,1509 p= 591	,1006 p= 721	,4467 p= 095	,4626 p= 083	-,5273 p= 043	-,3956 p= 144	,1548 p= 582	,2993 p= 279
BCF [Hz]	-,0189 p= 947	,3976 p= 142	-,5416 p= 037	,1433 p= 610	-,7055 p= 003	-,1737 p= 536	,2198 p= 431	,2038 p= 466
ALH [µm]	-,1262 p= 654	-,0105 p= 970	-,5079 p= 053	-,2504 p= 368	-,5945 p= 019	,0017 p= 995	-,1004 p= 722	-,0775 p= 784
71	-,1604 p= 568	-,1104 p= 695	,5410 p= 037	-,1211 p= 667	-,5867 p= 022	,5742 p= 025	-,2668 p= 336	-,2051 p= 463
72	-,1958 p= 484	-,4299 p= 110	,0254 p= 928	-,7816 p= 001	-,0346 p= 902	,4445 p= 097	-,3780 p= 165	-,2778 p= 316
77	,2052 p= 463	-,1757 p= 531	-,4452 p= 096	-,1201 p= 670	,4313 p= 108	-,1970 p= 482	-,6657 p= 028	,6653 p= 007
78	,0139 p= 961	-,0065 p= 982	-,1328 p= 637	,2029 p= 468	-,0407 p= 885	-,1913 p= 495	-,2285 p= 413	-,0432 p= 879
83	,0133 p= 962	,1270 p= 652	,1976 p= 480	,4556 p= 088	-,2505 p= 368	-,1824 p= 515	-,2016 p= 471	-,1779 p= 526
84	-,0770 p= 785	,2764 p= 319	-,0043 p= 988	-,6397 p= 010	-,0831 p= 768	-,2826 p= 307	-,0576 p= 839	-,0582 p= 837
85	,1489 p= 596	,3115 p= 258	,2111 p= 450	,5812 p= 023	-,3490 p= 202	-,2037 p= 466	-,0687 p= 808	-,3032 p= 272
86	-,3674 p= 178	,3020 p= 274	,1071 p= 704	-,5187 p= 048	-,1829 p= 514	-,0424 p= 881	-,1668 p= 553	-,2192 p= 432
88	,0440 p= 876	-,2521 p= 365	-,3344 p= 223	,0761 p= 788	,2297 p= 410	,2265 p= 417	-,0185 p= 948	,0987 p= 726
89	,0835 p= 767	,3218 p= 242	-,1899 p= 498	-,6553 p= 008	-,3432 p= 210	-,2999 p= 278	-,0034 p= 990	-,2481 p= 373
90	-,2058 p= 462	-,1814 p= 518	-,0764 p= 787	-,4356 p= 105	,2149 p= 442	,4913 p= 063	-,0767 p= 786	-,2297 p= 410
99	-,0317 p= 911	,0661 p= 815	-,0244 p= 931	,3474 p= 204	,0179 p= 949	-,2195 p= 432	-,2062 p= 461	-,0260 p= 927
100	-,1885	,1949	-,1838	-,2243	,3269	-,3100	-,3562	,0215

Variable	ACIDO CITRICO	ACIDO HIPURICO	1,3-DIOXAN-5-OL	ÁCIDO ESTEÁRICO	ÁCIDO FOSFÓRICO	ÁCIDO OLEICO	ÁCIDO PALMÍTICO	TAURINA
	p= 501	p= 486	p= 512	p= 421	p= 234	p= 261	p= 193	p= 939
101	,1312	-,0209	-,2214	,0129	,2561	-,1413	,0693	,1986
	p= 641	p= 941	p= 428	p= 964	p= 357	p= 616	p= 806	p= 478
104	,6953	-,2391	,0435	,0061	-,2394	-,2205	,4398	,2290
	p= 004	p= 391	p= 878	p= 983	p= 390	p= 430	p= 101	p= 412
107	,0127	-,1087	-,2539	,0637	,2979	-,1716	-,2598	-,0742
	p= 964	p= 700	p= 361	p= 821	p= 281	p= 541	p= 350	p= 793
123	-,0098	,0309	-,1128	,0834	,2532	-,3237	,1241	,1577
	p= 972	p= 913	p= 689	p= 768	p= 363	p= 239	p= 660	p= 575
127	-,0081	,0925	-,1530	,2798	,0444	-,1742	,2981	,3350
	p= 977	p= 743	p= 586	p= 313	p= 875	p= 535	p= 281	p= 222
128	,1113	,0305	-,1196	,1583	-,0072	-,1423	,3312	,4018
	p= 693	p= 914	p= 671	p= 573	p= 980	p= 613	p= 228	p= 138
130	,1953	,1664	-,1850	,5674	,0833	-,3983	,3051	,4870
	p= 485	p= 553	p= 509	p= 027	p= 768	p= 141	p= 269	p= 066
131	-,1090	,0660	-,0606	,0723	,1657	-,3069	-,2158	,0813
	p= 699	p= 815	p= 830	p= 798	p= 555	p= 266	p= 440	p= 773
132	-,0314	-,1361	-,1616	,0966	,0562	,1020	,0280	,3300
	p= 912	p= 629	p= 565	p= 732	p= 842	p= 718	p= 921	p= 230
133	,0801	,2523	-,0188	,6417	-,0776	-,3508	,0068	-,0077
	p= 777	p= 364	p= 947	p= 010	p= 783	p= 200	p= 981	p= 978
134	,2201	,2040	-,0574	,5066	,0881	-,4567	,1094	,1271
	p= 431	p= 466	p= 839	p= 054	p= 755	p= 087	p= 698	p= 652
135	,2056	-,4185	-,2355	-,3975	-,0031	,4107	,0132	,0683
	p= 462	p= 121	p= 398	p= 142	p= 991	p= 128	p= 963	p= 809
[] PROTEÍNAmg/ml	,1875	-,1414	-,0918	-,0780	,0895	-,3564	,1923	,3798
	p= 503	p= 615	p= 745	p= 782	p= 751	p= 192	p= 492	p= 163
VOLUME TOTAL DO EJACULADO	-,0006	,2682	-,3942	-,1071	,5941	-,1761	-,0439	,2104
	p= 998	p= 334	p= 146	p= 704	p= 020	p= 530	p= 877	p= 452
Total de Proteínas/ Ejaculado	,0673	,1344	-,3587	-,1352	,5182	-,2898	,0028	,2951
	p= 812	p= 633	p= 189	p= 631	p= 048	p= 295	p= 992	p= 286
TRIPTOFANO	,7441	,0423	-,2263	,2790	,0608	-,2685	,8017	,7629
	p= 001	p= 881	p= 417	p= 314	p= 830	p= 333	p= 000	p= 001
FRUTOSE	,5009	-,1543	-,2018	,1841	,0239	-,0276	,5738	,7620
	p= 057	p= 583	p= 471	p= 511	p= 933	p= 922	p= 025	p= 001
ÁCIDO LÁCTICO	,5307	-,1151	-,5985	,2502	-,6965	-,1873	,3947	,2240
	p= 042	p= 683	p= 018	p= 368	p= 004	p= 504	p= 145	p= 422
ORNITINA	,2408	,2058	-,0156	,0794	,0652	-,0368	-,0125	,0929
	p= 387	p= 462	p= 956	p= 778	p= 817	p= 896	p= 965	p= 742
MELATONINA	,1929	,2541	,0242	,5085	-,0589	-,2462	,5063	,4300
	p= 491	p= 361	p= 932	p= 053	p= 835	p= 376	p= 054	p= 110
Acetil Carnitina	,2966	,2418	-,0741	,5621	-,0869	,0211	,5838	,3091
	p= 283	p= 385	p= 793	p= 029	p= 758	p= 940	p= 022	p= 262
Carnitina	,2302	-,0451	-,4370	,3097	,3808	-,1310	,6735	,3900
	p= 409	p= 873	p= 103	p= 261	p= 161	p= 642	p= 006	p= 151
Fenilalanina	,6600	,0059	-,3045	,2606	,1105	-,1185	,6456	,6867
	p= 007	p= 983	p= 270	p= 348	p= 695	p= 674	p= 009	p= 005
Isoleucina_leucina	,7603	-,0909	,0074	,3750	-,2559	-,2055	,6555	,6411
	p= 001	p= 747	p= 979	p= 168	p= 357	p= 462	p= 008	p= 010
Methylbutanoyl Carnitina	,0944	,4519	,0829	,6272	-,0339	,0032	,4693	,4264
	p= 738	p= 091	p= 769	p= 012	p= 905	p= 991	p= 078	p= 113
ACIDO CITRICO	1,0000	-,0876	,0427	,1413	-,1947	-,4399	,6111	,7031
	p= ---	p= 756	p= 880	p= 616	p= 487	p= 101	p= 016	p= 003
ACIDO HIPURICO	-,0876	1,0000	,3008	,6887	-,0833	-,2288	,1389	,0287
	p= 756	p= ---	p= 276	p= 006	p= 768	p= 412	p= 621	p= 919
1,3-DIOXAN-5-OL	,0427	,3008	1,0000	,2919	-,9124	,0113	-,0924	-,2055
	p= 880	p= 276	p= ---	p= 291	p= 000	p= 968	p= 743	p= 463
ÁCIDO ESTEÁRICO	,1413	,6687	,2919	1,0000	-,2660	-,3228	,4780	,2022
	p= 616	p= 006	p= 291	p= ---	p= 338	p= 241	p= 072	p= 470
ÁCIDO FOSFÓRICO	-,1947	-,0833	-,9124	-,2660	1,0000	-,0423	,0308	,1433
	p= 487	p= 768	p= 000	p= 338	p= ---	p= 881	p= 913	p= 610
ÁCIDO OLEICO	-,4399	-,2288	,0113	-,3228	-,0423	1,0000	-,2673	-,4322
	p= 101	p= 412	p= 968	p= 241	p= 881	p= ---	p= 335	p= 108
ÁCIDO PALMÍTICO	,6111	,1389	-,0924	,4780	,0308	-,2673	1,0000	,7297
	p= 016	p= 621	p= 743	p= 072	p= 913	p= 335	p= ---	p= 002
TAURINA	,7031	,0287	-,2055	,2022	,1433	-,4322	,7297	1,0000
	p= 003	p= 919	p= 463	p= 470	p= 610	p= 108	p= 002	p= ---

ANEXO 1

XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

Concentração de proteínas no plasma seminal de garanhões.

Protein concentration in seminal plasma of stallions.

Verônica La Cruz Bueno^{1,2}, Henrique Boll de Araujo Bastos², Isabela Roese², Rodrigo Costa Mattos², Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}.

*¹HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil;

²REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil.

O plasma seminal é o fluido no qual os espermatozoides estão suspensos na ejaculação, fornecendo o meio de sobrevivência e favorecendo o transporte espermático. Variações na composição do plasma seminal de diferentes machos têm sido relacionadas a diferentes índices de fertilidade. Alterações nos níveis proteicos do plasma seminal podem contribuir para as desordens reprodutivas no garanhão. Nosso objetivo foi correlacionar a concentração de proteína do plasma seminal com a taxa de prenhez (TP) e cinética espermática de garanhões da Raça Crioula. Foram utilizados 24 garanhões em atividade sexual (um ejaculado de cada garanhão foi coletado com vagina artificial Hannover), com idade entre 4 e 20 anos, alojados nas proximidades de Porto Alegre (30°S, 51°W), RS, Brasil. A concentração espermática (CE) foi avaliada em câmara de Neubauer. As avaliações da Motilidade Total (MT); Motilidade Progressiva (MP); Imóveis (IM); Motilidade Circular (MC); Velocidade Curvilínea (VCL); Velocidade da Trajetória média (VAP); Velocidade em linha reta (VSL); Frequência de batimento do flagelo (BCF) foram realizadas através do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, AndroVision®, Minitube). A fertilidade foi avaliada através da prenhez no 16º dia, sendo que cada garanhão foi utilizado para inseminação de no mínimo 30 éguas. Para a quantificação das proteínas do plasma seminal, 5mL de sêmen fresco foram submetidos a centrifugação a 600xg por 10 min, em temperatura ambiente e o sobrenadante foi armazenado a -80°C. Todas as amostras do plasma seminal foram armazenadas em triplicata no ultrafreezer a -80°C. Uma das replicadas de cada amostra foi descongelada e centrifugada a 10.000 x g por 60 min a 4°C para remover detritos e coletar o sobrenadante. O conteúdo proteico foi determinado de acordo com o método de Bradford. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (TP ≥ a 51%) e Grupo 2 (TP ≤ a 50%). Para análise estatística foi utilizada correlação de Pearson, sendo o nível de significância P<0,05. Os valores médios e desvios padrão das variáveis observadas nos Grupos 1 e 2 foram respectivamente: CE (132,75x10⁶ /mL ± 65,43 e 197, 25x10⁶ /mL ± 154,79); TP (76 % ± 9 e 31% ± 7); MT (67% ± 18 e 38% ± 22); MP (34% ± 21% e 18% ± 10); IM (30% ± 20 e 61% ± 22); MC (4% ± 4 e 2 % ± 1); VCL (100µm/s ± 41 e 70µm/s ± 37); VAP (47µm/s ± 19 e 32µm/s ± 15), VSL (38µm/s ± 15 e 25 µm/s ± 11), BCF (12µm/s ± 5 e 8 µm/s ± 4), Proteínas mg/ml (24,76mg/mL ± 6,18 e 29,27mg/mL ± 18,61), Volume total do ejaculado (46mL ± 24 e 33mL ± 20) e Total de Proteínas por ejaculado (1183mg ± 713 e 868 mg ± 446). Foi encontrada correlação positiva entre Proteínas mg/ml com CE (r=0,602/P<0,001) e Volume total do ejaculado com BCF (r=0,517/P<0,001). O Total de Proteínas por ejaculado tendeu a ser maior no Grupo 1, em relação ao Grupo 2 (P=0,08). Apenas uma correlação foi encontrada entre a concentração

de proteínas e a cinética espermática, indicando que a concentração proteica se mantém em animais com características seminais e índices de fertilidade diferentes. A tendência de maior quantidade de proteínas totais no plasma seminal encontradas no Grupo 1 está relacionado com o volume seminal. O entendimento da composição de proteínas do sêmen pode ser diretamente aplicável às condições de laboratório e resultar em maior eficiência na produção de potros. Os resultados verificados neste estudo sugerem que a influência das proteínas do plasma seminal sobre os parâmetros de qualidade do sêmen e fertilidade está associada ao tipo de proteína presente e não à concentração de proteínas. Palavras chaves: plasma seminal, proteína, equino.

*E-mail: veronicalacruzbueno@hotmail.com



The image is a certificate of honor from the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA). The top section features a blue background with a white sperm cell graphic and the text: "XXIV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal" and "VIII International Symposium on Animal Biology of Reproduction - Joint Meeting". The CBRA logo is on the right. The main text, in white on a dark blue background, reads: "O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal certifica que o trabalho intitulado 'Concentração de proteínas no plasma seminal de garanhões', dos autores 'V. La Cruz Bueno, H.B.A. Bastos, I. Roese, R.C. Mattos, S.F. Rechsteiner' recebeu Menção Honrosa na categoria 'Reprodução de equinos'." Below this is a signature and the name "Dr. Marcelo Rezende Luz, Presidente do CBRA e do XXIV CBRA e VIII ISABR - Joint Meeting". The bottom section lists sponsors: "Realização: CBRA Colégio Brasileiro de Reprodução Animal"; "Parceiros empresariais: WTA, Frenas24h, minitube, ourofino, imv, Biolupharma"; and "Apoio institucional: CNPq, CRMV MG, and the State of Mato Grosso do Sul." The bottom right corner of the certificate features a small black silhouette of a horse.

ANEXO 2

IX INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION

PHENYLALANINE MAY BE PROPOSED AS A BIOMARKER OF FERTILITY IN STALLIONS.

Verônica La Cruz Bueno^{1,2}, Henrique Boll de Araujo Bastos², Rodrigo Costa Mattos², Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}.

*¹HISTOREP - Federal University of Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brazil;
²REPROLAB - Faculty of Veterinary Medicine, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil.

Stallions' selection as sires is based on three qualities: pedigree, performance record, and conformation. Fertility or fertility potential is usually, at best, a secondary consideration. Fertility can be determined by parameters that reflect breeding success rates or by using sperm characteristics, which have reported inconsistent results. Metabolomics is one of the most recent -OMICS techniques developed after genomics, transcriptomics, and proteomics. Analyzing the entire metabolome makes it possible to access the final products of the metabolism within a biological system. The metabolites are small molecules, less than 1kDa, derived from metabolic pathways and include hormones, amino acids, lipids, carbohydrates, and nucleotides. The composition of the metabolome determines the current phenotypic state of a cell. It actively changes in response to cellular and extracellular stimuli, making metabolomics studies more informative than the other -OMICS approaches, particularly in the investigation of cellular response to exogenous stimuli or in the case of pathology. The metabolomic profile of the seminal plasma was already analyzed in different species like humans, rhesus monkeys, mice, turkeys, bull, carp, rainbow trout, boar, donkeys, goats, and giant panda. In this study, 24 Criollo stallions were used, with ages ranging from 4 to 20 years old and weighing 450 to 500 Kg. The animals were housed in breeding centers in southern Brazil (30°S, 51°W). The Committee of Ethical Use in Animal Experimentation at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil approved the study (protocol number 38666). One ejaculate was collected from each stallion during the breeding season. The selected stallion's fertility was evaluated based on the

pregnancy rate per cycle on the 16th day after insemination. At least 30 inseminated mares per stallion and two breeding seasons were considered. Pregnancy rates ranged from 20% to 95%. The animals were divided into two groups: group High Pregnancy (HP), with a pregnancy rate per cycle over 50%, and group Low Pregnancy (LP), with a pregnancy rate per cycle below 50%. The identification of the target metabolite was performed by liquid chromatography. Chromatography was performed using Kinetex® Phenyl-Hexyl analytical column (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) with the binary mobile phase at a flow of 350 µL min⁻¹ and injection volume of 10 µL. The LC-QTOF-MS system was a Nexera x2 liquid chromatograph (Shimadzu) coupled to an Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics). The software utilized for system operation and data acquisition were Compass Hystar 3.2 and TASQ. TOF-MS and bbCID (MSMS/MS) data were acquired in the m/z range of 50 to 1000 Da. Metabolite phenylalanine - an amino acid- presented the largest area in the LP group (4,402,336 ± SD 1,225,568) compared to the HP group (2,763,743 ± SD 1,237,550) P= 0.008. This amino acid contributes to several cellular and biological processes, such as antioxidant detoxification, metabolic processes of reactive oxygen species, and oxidoreductase activity. In bulls, adding small concentrations of phenylalanine resulted in adverse effects on the viability of sperm. In conclusion, Phenylalanine metabolite may be proposed as a marker of low fertility for stallions, given its positive correlation with the conception rate.