



Eduardo Jorge
Mónica Esteves

Biomarcadores em *Ovis aries*



Eduardo Jorge
Mónica Esteves

Biomarkers in *Ovis aries*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Marlene Maria Tourais de Barros, Professora Associada com Agregação do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa e Coorientação da professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Não tenho palavras para descrever a pessoa a quem dedico esta dissertação. Rosa Branco da Silveira (1938-2009) pela fé que depositou em mim, pelos ensinamentos dados, pela felicidade de me ver amar a cultura, a educação. Hoje é particularmente um dia muito feliz para ambos. Sei que estará orgulhosa de mim por ter chegado até aqui e eu orgulhoso dela por ter sido como foi.

Dedico também ao meu avô Fernando porque sei que está feliz e que eu o faço feliz. As pessoas mais lindas são estas. A elas o meu obrigado e a razão desta dedicatória ser tão pessoal.

o júri

Presidente

Professora Doutora Anabela Pinto Rolo
professora auxiliar, Universidade de Aveiro

Vogal – Arguente principal

Professora Doutora Helena Maria Vala Correia
professora coordenadora, Instituto Politécnico de Viseu

Vogal - Orientador

Professora Doutora Marlene Maria Tourais de Barros
professora associada com agregação, Universidade Católica Portuguesa

agradecimentos

Esta dissertação não teria sido possível sem o contributo valioso de um grupo de pessoas. Em primeiro lugar, uma palavra de agradecimento e de apreço sincero à minha orientadora, professora doutora Marlene Barros, cujos conselhos sempre sábios e oportunos, apoio incondicional, dedicação constituíram uma mais valia inestimável para a minha investigação, recordando ainda as longas horas que comigo dispensou daí a minha responsabilidade pelos cabelos brancos que apareciam pois infatigavelmente recordava-me que a ciência só merece esta classificação quando está aberto ao diálogo intelectual.

Agradeço também a colaboração da professora doutora Maria José e professor doutor Nuno Rosa pelas muitas palavras de incentivo e pelo entusiasmo que me inculcaram nos momentos mais difíceis desta jornada, da sua clara abertura para a discussão do tema e troca de experiências que em muito me ajudaram com o acompanhamento interessado pelo meu trabalho.

Uma palavra de reconhecimento à doutora Helena Vala pela sua vontade de trabalho e ajuda ao longo deste percurso.

Não posso deixar esquecer a colaboração preciosa do médico veterinário Lourenço, responsável pelas colheitas de saliva, bem como a aluna Marina Pereira por terem feito um excelente trabalho, participado de forma integrativa em parte da componente prática. Um obrigado também às colegas Yuliya Dulyanska, Carla Amaral e engenheira Carla, sempre presentes.

Por fim, permitindo-me uma nota de cariz mais pessoal, o meu obrigado vai para a toda a minha família pela confiança incondicional que me depositaram, para o meu avô e padrinho Fernando pela disponibilidade financeira, ao meu pai pela pressão e responsabilidade que colocou sobre mim, ao Fernando a quem devo a alegria, entusiasmo e a excelentes refeições que me proporcionou e que me fizeram atentar que o saber tem a sua raiz etimológica na palavra sabor. À Mónica que nos momentos mais difíceis me fez acreditar que o meu trabalho iria ser valioso e valorizado.

À mãe Rosa, Bé e Zé, Celina e António que são amigos da minha infância, que me ajudaram na tarefa de crescer saudável e com apreço pela cultura, leitura pelos números, pela natureza e pelas pessoas.

Por último para à minha Mãe, que lutou pela minha felicidade a cada instante e que me impulsionou para o mundo em que vivo e me ensinou a acreditar que a alegria está sempre presente quando nos superamos e atingimos os nossos objectivos!

palavras-chave

OvisOme, base de dados, proteína, saliva, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, doença de Johne

resumo

Ferramentas que armazenem e procedam à catalogação das proteínas identificadas em proteomas resultantes de amostras de tecidos diversos recolhidos a partir de indivíduos representativos de situações fisiológicas e patológicas, constituem instrumentos poderosos para a integração da informação já publicada. Muita informação sobre os mecanismos moleculares subjacentes a patologias pode hoje ser gerada a partir de estratégias bioinformáticas.

No âmbito de projetos anteriormente desenvolvidos foi construída uma base de dados, o OralOme. O presente trabalho tem como objetivo a criação de uma base de dados, o OvinOme, aplicando a mesma metodologia desenvolvida para saúde humana, agora para o armazenamento e catalogação de proteínas identificadas a partir dos proteomas parciais de *Ovis aries*. A criação desta ferramenta bioinformática contribuirá para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico em vida, capazes de detetar as principais patologias que grassam nos rebanhos de ovelhas Serra da Estrela.

O desenvolvimento da base de dados passa pelo compilar manual das proteínas identificadas pelos vários estudos publicados relativamente a *Ovis aries*, anotando toda a informação relativa à caracterização do indivíduo dador da amostra, tipo de amostra biológica, técnicas utilizadas para a identificação das proteínas e toda a informação conhecida relativa a cada proteína catalogada.

O desenvolvimento de um método de diagnóstico em vida passa pela concepção de protocolos de colheita, armazenamento e caracterização da qualidade da amostra. Assim no âmbito de presente trabalho foi também objectivo o desenvolvimento de toda a estratégia para recolha de amostras de saliva em ovinos, transporte, armazenamento e avaliação da qualidade da amostra.

A criação de um banco de saliva de rebanhos de ovelhas Serra da Estrela será um objectivo a cumprir em termos de futuro, visando o estabelecimento do diagnóstico precoce utilizando a saliva como fluido para avaliação de proteínas que identifiquem cada patologia, determinadas por análise *in silico* recorrendo à ferramenta bioinformática OvinOme desenvolvida no âmbito do presente trabalho.

keywords

OvisOme, database, protein, saliva, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Johne disease

abstract

Tools that store and proceed to the cataloging of proteins identified in proteomes derived from samples of various tissues collected from individuals representative of physiological and pathological situations, are powerful tools for the integration of information already published. Much information about the molecular mechanisms underlying pathologies can now be generated from bioinformatic strategies.

Under previously developed design was built a database, the OralOme. This work aims to create a database, the OvisOme, applying the same methodology developed for human health now for storage and cataloging of proteins identified from the partial proteomes of *Ovis aries*. The creation of this bioinformatics tool will contribute to the development of diagnostic methods in life, able to detect major diseases that are rife in flocks of sheep Serra da Estrela.

The development database is compiled by the proteins identified by several studies published for manual *Ovis aries*, noting all the information on the individual characteristics of the donor of the sample, type of biological sample, techniques for identifying proteins and whole known information cataloged for each protein.

The development of a method of diagnosis in living passes through the design of the harvesting, storage and characterization of the quality of the sample protocols. So within this study was also aimed at developing the whole strategy for collecting samples of saliva in sheep, transport, storage and evaluation of sample quality.

The creation of a database of flocks of sheep saliva Serra da Estrela is a key objective for the future, for the establishment of early diagnosis using saliva as a fluid for evaluation of proteins that identify each pathology, determined by in silico analysis using OvisOme bioinformatics tool developed under this work.



“A verdadeira viagem de descoberta não consiste em procurar novas terras, mas em ver com novos olhos”

Marcel Proust

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 A importância da integração da informação biológica para o esclarecimento de mecanismos funcionais	1
1.2 Bases de dados sobre proteínas	1
1.3 Encontrar biomarcadores	2
1.4 Ferramentas bioinformáticas	3
1.4.1. UniProt	3
1.4.2 AgBase	3
1.4.3 OralCard	4
1.5 Ovinicultura na Região de Viseu	4
1.5.1 A Doença de Johne	5
1.5.2 Mecanismos da infecção por <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	6
2. Objetivos	12
3. Material e Métodos	14
3.1 Da compilação dos proteomas à criação da base de dados OvisOme	16
3.1.1 OvisOme: Anotação do proteoma de <i>Ovis aries</i>	20
3.1.2 OvisOme: Construção da base de dados	27
3.1.3 Caracterização funcional das proteínas identificadas em saliva de ovelha e proteínas exclusivas em situação de doença	28
3.2 Colheita, armazenamento e caracterização de amostras de saliva em ovelhas Serra da Estrela	37
3.2.1 Estabelecimento da metodologia para a obtenção das amostras de saliva	37
3.2.2 Estabelecimento do processo de registos de amostras de saliva	40
4. Resultados e Discussão	43
Análise <i>in silico</i>	44
4.1 Revisão e anotação da informação sobre os proteomas parciais de <i>Ovis aries</i>	45
4.2 Patologias e as proteínas catalogadas na base de dados OvisOme	52
4.2.1 Caracterização das proteínas identificadas como exclusivas de patologias	53
4.2.1 Caracterização das proteínas identificadas na saliva	55
Componente Experimental	59
4.3 Colheita, armazenamento e caracterização de amostras de saliva em ovelhas Serra da Estrela	60
4.3.1 Estabelecimento da metodologia para a obtenção das amostras de saliva	60
4.3.2 Estabelecimento do processo de registos de amostras de saliva	61
5. Conclusões	65

6. Trabalho Futuro	66
7. Bibliografia	67
7. Anexos	72

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis observado por microscopia electrónica de varrimento com ampliação 50,000 vezes</i> ¹⁰ .	5
<i>Figura 2: Lesões provocadas por Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis na região anatómica do ílio. Lesões graves em todas as camadas do intestino: infiltração dos linfócitos, monócitos, células do plasma e macrófagos na mucosa e submucosa</i> ¹²	5
<i>Figura 3: Composição da parede de Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i> ¹³ .	6
<i>Figura 4: Eventos iniciais de infeção por M. paratuberculosis</i> ¹⁴ .	8
<i>Figura 5: Inibição da maturação fagossomal por M. paratuberculosis</i> ¹¹ .	9
<i>Figura 6: Inibição da sinalização de IFN por MAP</i> ¹¹ .	10
<i>Figura 7: Fluxograma ilustrando a estratégia de desenvolvimento utilizada para a realização do trabalho.</i>	15
<i>Figura 8: Pesquisa avançada NCBI PubMed utilizando como palavra-chave “sheep AND saliva”.</i>	16
<i>Figura 9: Pesquisa avançada PubMed utilizando as palavras-chave “sheep” e “proteom*”.</i>	16
<i>Figura 10: Resultados da pesquisa avançada PubMed utilizando como palavras-chave. “sheep” e “proteom*”.</i>	17
<i>Figura 11: Exemplo de seleção do PubMed ID – artigos resultantes da pesquisa avançada PubMed para análise na plataforma BECAS.</i>	18
<i>Figura 12: Inclusão do código PubMed no local de anotação da plataforma BECAS.</i>	18
<i>Figura 13: Resultados da ferramenta BECAS para análise – Cores diferentes para cada grupo de termos biomédicos inseridos na plataforma.</i>	19
<i>Figura 14: Catalogação das proteínas anotadas na base de dados OvisOme: título do artigo e respetivas proteínas identificadas; Códigos UniProt (http://www.uniprot.org/) e em que organismo estão presentes. Catalogação manual da base de dados OvisOme.</i>	23
<i>Figura 15: Anotação das características do organismo, como a idade, género, condição em que foi identificada as proteína (saúde/patologia), os métodos de recolha e análise, o tipo de estudo e a citação.</i>	23
<i>Figura 16: Exemplo de tabela descritiva de proteínas identificadas em saliva (Lamy et al. 2009).</i>	24
<i>Figura 17: Procedimento para a revisão manual da informação sobre as proteínas.</i>	25
<i>Figura 18: Sequência de obtenção do código UniProt – BLAST. 1) Proteína identificada como outro organismo; 2) alinhamento local através da ferramenta BLAST no UniProt; 3) pesquisa da proteína mais idêntica à proteína inicial mas pertencente ao organismo Ovis aries; 4) escolha da proteína com a identidade mais próxima de 100% que indica o grau de homologia entre as proteínas; 5) resultado final depois da escolha da proteína pela identidade agora com o código correspondente ao organismo Ovis aries.</i>	26
<i>Figura 19: Proteínas revistas pela secção Swiss-Prot no organismo Ovis aries. Anotação automática das proteínas revistas no OvisOme.</i>	28

<i>Figura 20: Plataforma AgBase – Ferramentas GO Retriver e GO Slim Viewer assinaladas a vermelho. Figura adaptada no portal Web Agbase.</i>	29
<i>Figura 21: Página inicial da ferramenta GORetriever da plataforma bioinformática Agbase (http://www.agbase.msstate.edu/). Figura adaptada da ferramenta bioinformática GORetriever consultável no portal Web Agbase.</i>	30
<i>Figura 22: Descarregar o ficheiro “GO Summary file (for use in GOSlimViewer)” para posterior utilização na ferramenta “GOSlim Viewer”. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GO Retriver consultável no portal Web Agbase.</i>	31
<i>Figura 23: Página inicial da ferramenta informática GoSlimViewer obtida através da plataforma Agbase http://www.agbase.msstate.edu/. Seleção da opção “Generic” na seção “select GoSlim Set”. Fazer o upload do ficheiro descarregado na opção “Go Summary file (for use in GOSlim Viewer)” na ferramenta GoRetriever. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web Agbase.</i>	32
<i>Figura 24: Selecionar a opção “View Biological Process”, a seguir obtém-se os processos biológicos em que estão envolvidas as proteínas. Ao lado do nome do processo está indicado o número de proteínas envolvidas em cada um destes. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web Agbase.</i>	32
<i>Figura 25: Selecionar a opção “View accesions for each clim id” na página dos resultados da ferramenta bioinformática GOSlimViewer, a seguir, o ficheiro obtido do GoSlimViewer “View accesions for each slim id text only” foi descarregado e aberto numa folha do Microsoft Excel® 2013. Figuras adaptadas da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web Agbase e do Microsoft Excel® 2013. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web AgBase.</i>	33
<i>Figura 26: Tabela dinâmica – Proteínas salivares de ovino com os processos biológicos correspondentes. 1) Importação dos resultados do AgBase exemplificados na figura 23; 2) Criação de tabelas dinâmicas com a função ‘plot table’ no Excel; 3) Tabela dinâmica criada; 4) Criação de uma segunda tabela dinâmica; 5) conversão dos dados numa tabela funciona.</i>	36
<i>Figura 27: Montagem do material da colheita de saliva: a) tubos 50ml b-c) pontas de micropipeta p1000. A montagem é feita com a inserção de 7 pontas nos tubos de 50ml e depois segue para esterilização. d) Apósautocalvagem os rolhões são entregues em pacotes à parte para serem colocados na cavidade oral da ovelha e posteriormente no tubo esterilizado.</i>	38
<i>Figura 28: Recolha de saliva em ovinos da Escola Agrária de Viseu. Os rolhões são seguros por uma pinça hemostática que os faz passar na cavidade oral durante 20-30 segundos. Posteriormente os rolhões são inseridos nos tubos de 50ml sobre as pontas p1000.</i>	38
<i>Figura 29: Mala térmica criada para acompanhar o veterinário e a sua assistente durante as colheitas com todo o material necessário (gel refrigerante, tubos vazios e rolhões).</i>	39
<i>Figura 30: A catalogação dos tubos de colheita de saliva.</i>	39
<i>Figura 31: Resultado da pesquisa avançada PubMed – 118 artigos resultantes da pesquisa com as palavras-chave “sheep AND proteom*”</i>	45

<i>Figura 32: Total de proteínas da base de dados OvisOme identificando o número de proteínas em estado de saúde, patologia e comuns em saúde e patologia.</i>	48
<i>Figura 33: Distribuição das proteínas depositadas na base de dados OvisOme em saúde de acordo com o tipo de amostra biológica em que foram identificadas.</i>	49
<i>Figura 34: As raças utilizadas para os estudos de proteômica (Sarda, Romanov, Merino, Comisana, Clun Forest, Corriedale, German Blackface, New Zealand Borderdale, e crossbreed), respetivo número de proteínas identificadas, bem como o número de proteínas sem raça atribuída.</i>	50
<i>Figura 35: Distribuição dos dados de regulação em proteínas anotadas manualmente na base de dados OvisOme.</i>	51
<i>Figura 36: Distribuição das proteínas depositadas na base de dados OvisOme de acordo com as patologias em que foram identificadas.</i>	52
<i>Figura 37: Distribuição das proteínas depositadas na base de dados OvisOme de acordo com as patologias em que foram identificadas.</i>	53
<i>Figura 38: Tabela funcional com proteínas identificadas na saliva de ovelha e que são comuns com proteínas identificadas em patologias. É apresentada a caracterização das ontologias que descrevem os processos biológicos em que participam as proteínas.</i>	57
<i>Figura 39: Distribuição do número de colheitas de saliva efetuadas em cada mês</i>	60
<i>Figura 40: Distribuição do número de colheitas de amostras de saliva efetuadas em cada freguesia da região de Viseu.</i>	61
<i>Figura 41: Gel SDS-PAGE: MM-marcador molecular Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Protein Marker, Perfil de proteínas obtido para cada amostra de saliva correspondente ao dador de acordo com a tabela 10 (poço 1 a 9).</i>	63
<i>Figura 42: Avaliação dos perfis de proteínas de ovelha e cabra. 1) Perfil de proteínas de ovelha Serra da Estrela. 2) O perfil de proteínas de ovelha (S) e cabra (G) apresentado por Lamy et al 2008.</i>	64

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1: Campos e termos da base de dados OralOme e OvisOme – Construção do endereço de informação. Campos iguais estão anotados com o símbolo ✓ e os campos distintos ou inexistentes com o símbolo X.</i>	21
<i>Tabela 2: Dados de registo na tabela da recolha das amostras de saliva</i>	42
<i>Tabela 3: Descrição das publicações compiladas na base de dados OvisOme.</i>	46
<i>Tabela 4: Artigos considerados para constituir a informação da base de dados OvisOme.</i>	47
<i>Tabela 5: Lista das proteínas exclusivas das patologias incluídas no OvisOme.</i>	54
<i>Tabela 6: Proteínas exclusivas da patologia Mastitis (tabela parcial, completa no anexo 7)</i>	55
<i>Tabela 7: Proteínas do soro, com diferenças na regulação na doença de Johne e identificadas como possíveis marcadores moleculares da patologia.</i>	58
<i>Tabela 8: Amostras usadas na corrida de SDS-PAGE e respetivas características.</i>	62

COMUNICAÇÕES

COMUNICAÇÕES ORAIS

Esteves, E; Rosa ,N; Correia, MJ; Vala, H; Barros, M “OvinOralOma: base de dados de proteómica oral de *Ovis aries*”. IV Congresso Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias. Oeiras, Portugal 3 a 5 de Abril 2014

COMUNICAÇÕES EM PAINEL

Esteves, E; Rosa ,N; Correia, MJ; Vala, H; Barros, M “OvinOralOma: base de dados de proteómica oral de *Ovis aries*”. IV Congresso Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias. Oeiras, Portugal 3 a 5 de Abril 2014

ABREVIATURAS

M. paratuberculosis – *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

Obs. - Observações

UniProt - *The Universal Protein Resource*

UniProtKB - *The UniProt Knowledgebase*

UniProtKB AC - *UniProtKB Accession Number*

GI number - *genInfo identifier*

BLAST – *The Basic Local Alignment Search Tool*

GO – *Gene ontology*

CSF – Fluido cerebrospinal

Ig - Immunoglobulina

TNF- α - Fator de necrose tumoral

IL – Interleucina

1. INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA DA INTEGRAÇÃO DA INFORMAÇÃO BIOLÓGICA PARA O ESCLARECIMENTO DE MECANISMOS FUNCIONAIS

Atualmente sabe-se que a compreensão dos mecanismos moleculares associados a uma determinada patologia só é possível se conseguirmos identificar e quantificar moléculas presentes no tecido em causa¹.

A biologia molecular, a bioquímica e a biofísica têm sido extremamente bem-sucedidas no esclarecimento das maquinarias moleculares da vida, caracterizando os seus componentes individuais¹.

Uma vez que as proteínas são os elementos moleculares que mais se aproximam das características funcionais observáveis (fenótipos), a sua identificação, ou seja, o esclarecimento de um proteoma, adquire especial relevância na caracterização funcional de um dado sistema biológico. Os proteomas dos eucariotas são extremamente complexos, o que faz com que a exploração por abordagem proteômica seja uma tarefa bastante exigente em termos técnicos¹.

O estudo da biologia de sistemas é atualmente auxiliado pela maior facilidade com que os investigadores geram dados (possível com o desenvolvimento de técnicas de alto rendimento da genómica, proteómica, transcriptómica e metabolómica) e os armazenam e distribuem (só possível com a internet e ferramentas bioinformáticas), bem como da cooperação de especialistas de vários ramos da ciência tais como informáticos, matemáticos, físicos e engenheiros¹.

A Bioinformática e as inúmeras ferramentas desenvolvidas por esta área científica permitem extrair informação com significado dos dados gerados pelas diversas ciências Ómicas de modo a criar hipóteses e modelos de estudo.

As bases de dados tornam possível a utilização organizada das quantidades massivas de dados. A quantidade de dados armazenados e o número de bases de dados tem aumentado exponencialmente nos últimos anos¹.

1.2 BASES DE DADOS SOBRE PROTEÍNAS

As proteínas são o produto molecular dos genes, sendo vitais para os organismos vivos. A expressão das proteínas depende de condições moleculares e ambientais, que conseqüentemente são expressas em momentos diferentes e sob condições diferentes.

Proteómica é atualmente uma área de estudo que gera uma grande escala de identificação de alto rendimento e compreensão de proteínas, que nos serve como uma ferramenta alternativa aos métodos moleculares. Proteómica é um campo que foi definido como: "o uso de medição do nível de proteína-quantitativa da expressão do gene para caracterizar os processos biológicos" e descodificar os mecanismos de controlo da expressão génica². Um grande desafio para a bioinformática na pesquisa do proteoma é a análise e visualização de dados³.

A análise dos proteomas de diversos organismos biológicos representa um dos desafios na era pós-genoma e é uma fonte de informação rica para biológica. Esta informação é armazenada em bancos ou bases de dados localizados em todo o mundo. A diversidade de dados é devido aos diferentes métodos utilizados para a pesquisa proteoma, tais como eletroforese 2D, espectrometria de massa, sequenciação de proteínas, e outros métodos³.

1.3 ENCONTRAR BIOMARCADORES

As tecnologias que nos permitem decifrar interações celulares entre biomoléculas (interatómica), juntamente com aqueles que medem os fluxos de metabólitos e cascatas de sinalização tomaram o centro do palco em biologia de sistemas⁴.

Interatómica pode ser aplicada numa abordagem de sistemas ou para o estudo de um conjunto específico de proteínas. Enquanto os primeiros podem identificar as chamados redes de interação na sinalização celular, este último é capaz de descrever de forma fiável sub-redes com mais detalhe⁴.

Até à data, o estudo do interatoma foi principalmente explorado por interações envolvendo proteínas nas áreas de sinalização celular e procura de marcadores moleculares⁴.

Marcadores biológicos (biomarcadores) incluem ferramentas e tecnologias que podem auxiliar na compreensão da previsão, causa, diagnóstico, progressão, regressão, ou resultado de tratamento da doença⁵

Um grande número de biomarcadores pode ser identificado na saliva, desde metais pesados a proteínas. Sendo que, ultimamente a análise de "proteínas chave" ou biomarcadores proteicos que permitam o diagnóstico de determinadas patologias tem vindo a despertar cada vez mais a atenção da comunidade científica. O estudo da proteómica salivar tem a potencialidade de permitir a identificação de proteínas específicas para doença sendo que a caracterização destas proteínas do ponto de vista fisiopatológico permite obter informação sobre o estabelecimento, progressão e prognóstico da patologia⁶.

1.4 FERRAMENTAS BIOINFORMÁTICAS

As ferramentas bioinformáticas são instrumentos que permitem a análise integrada de dados produzidos em grande escala e que se encontram armazenados em múltiplas bases de dados. A base conceptual para o entendimento da biologia do sistema pressupõe a capacidade instrumental de integrar toda a informação existente por forma a ser possível retirar significado biológico a partir da evidência existente⁶.

Sendo assim houve a necessidade de combater essas limitações e criaram-se as aplicações computadorizadas de armazenamento de dados (bases de dados) e as aplicações computadorizadas de processamento de dados.

Para um melhor conhecimento do proteoma do *Ovis aries* é necessário o uso de ferramentas bioinformáticas nas áreas de estudo de proteómica e interatómica. Existem numerosas ferramentas bioinformáticas, que vão contribuir para a realização deste trabalho.

1.4.1. UniProt

As bases de dados dedicadas a armazenar toda a informação sobre proteínas armazenam um leque variado de informação. A base de dados que mais dados contém é o UniProt. É um dos exemplos de base de dados sobre proteínas de inúmeros organismos. Inclui atualmente, duas secções: UniProtKB/Swiss-Prot que contém a informação sobre proteínas que foi anotada e revista manualmente e a UniProtKB/TrEMBL⁷ que é anotada automaticamente através de previsões e ainda não foi revista manualmente a informação registada.

A proteómica surge assim como a resposta a estas perguntas, sendo considerada uma parte fundamental de uma análise integrativa e multidisciplinar em diferentes níveis, alongando-se desde os genes até ao fenótipo expresso nas proteínas.

No estudo completo das proteínas, que inclui a estrutura e função, os as pesquisas que utilizam base de dados e auxiliam nos diferentes ramos da proteómica.

1.4.2 *AGBASE*

A *AgBase* (<http://www.agbase.msstate.edu/>) fornece recursos para facilitar a modelagem de dados de genómica funcional e anotação estrutural e funcional dos animais agrícolas importantes (ovela, cabra, vaca, galo, entre outros), planta, micróbio e de genomas de parasitas.

Esta é uma das ferramentas bioinformáticas usadas neste trabalho, dado que é uma base de dados na qual é feita a anotação das ontologias. É possível encontrar nesta base de dados, a anotação de várias proteínas do *Ovis aries*, e portanto úteis no presente estudo⁸.

1.4.3 ORALCARD

O OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>) é uma ferramenta bioinformática reúne os resultados de 55 artigos com revisão manual e refletem o ecossistema molecular oral (OralPhysiOme). Compreende informação experimental disponível a partir do proteoma oral, tanto de humano (OralOme) como de origem microbiana (MicroOralOme) estruturada em proteínas, doença e organismo.

Esta ferramenta é um recurso fundamental para os investigadores que pretendem entender as bases moleculares implicados na biologia e mecanismos de doenças da cavidade oral, podendo identificar possíveis biomarcadores a partir de amostras de saliva¹.

Neste trabalho o OralCard é usado para estudar as proteínas humanas homólogas das proteínas exclusivas de uma dada doença identificadas na saliva de *Ovis aries*.

1.5 OVINICULTURA NA REGIÃO DE VISEU

Na Região de Viseu existe uma espécie autóctone de ovinos denominada Serra da Estrela. De acordo com censos 2013 existem 16789 ovinos dispersos por 625 explorações (www.anidop.net), sendo os animais destinados predominantemente para a produção de leite com vista à manufactura de queijos típicos desta região.

Uma das patologias endémicas desta região é a doença de Johne também conhecida como paratuberculose. Os animais infetados são detectados tardiamente, podendo ser veículos para propagarem a doença por todo o rebanho acarretando custos avultados para os produtores para além do evidente perigo em termos de saúde pública.

A doença de Johne foi descrita pela primeira vez em 1895 por Johne e Forthingham. A pesquisa de formas de diagnóstico precoce e eventual contribuição para o tratamento continua a ser um desafio⁹.

A concentração de ovinos como resultado das práticas de agropecuária modernas, tornou a paratuberculose uma patologia emergente a nível mundial.

A doença de Johne apresenta algumas analogias com a doença de Crohn que afecta humanos e cuja etiologia é promovida pela bactéria *M. paratuberculosis*⁹.

1.5.1 A DOENÇA DE JOHNE

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*) é o agente patogénico causador da doença de Johne (figura 1). As manifestações clínicas da infecção por *M. paratuberculosis* incluem: diarreias, perda progressiva de peso, decréscimo na produção de leite e uma degradação acentuada na qualidade de vida do animal. Estes sintomas clínicos ocorrem por norma entre os 2-5 anos após a infecção inicial que geralmente acontece no período neonatal.



Figura 1: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* observado por microscopia electrónica de varrimento com ampliação 50,000 vezes¹⁰.

A patologia associada a doença de Johne é localizada na fase inicial no terminal do ílio, mas pode chegar a afetar o intestino por completo. A alteração das paredes do intestino é caracterizada pela formação extensiva de granulomas na submucosa¹¹. Esta situação pode ser observada na figura 2.

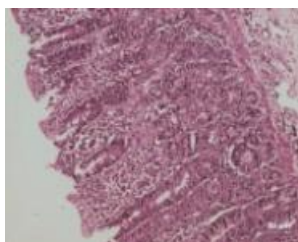


Figura 2: Lesões provocadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* na região anatómica do ílio. Lesões graves em todas as camadas do intestino: infiltração dos linfócitos, monócitos, células do plasma e macrófagos na mucosa e submucosa¹²

A bactéria é ingerida pela via oral pelo consumo de material contaminado tal como leite, colostro, fezes, solo ou até pelo contacto oral com as superfícies infectadas. A transmissão do microrganismo pode ainda ocorrer através de outros fluidos corporais como saliva, fluido uterino ou sémen¹¹.

1.5.2 MECANISMOS DA INFECÇÃO POR *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS*

Uma das características particulares das micobactérias é a estrutura e a composição do seu envelope. O envelope de *M. paratuberculosis* consiste em quatro folhetos (figura 3) que descritos do interior para o exterior consistem numa membrana plasmática composta por bicamada lipídica e proteínas transmembranares; uma camada densa de electrões formada por péptidoglicanos ligados covalentemente através de pontes de diglicosilfosforil a uma cadeia ramificada de arabinoglicanos. A camada externa apresenta uma constituição que varia de espécie para espécie¹¹.

Uma molécula em destaque do envelope é LAM ou *Lipoarabinomannan*, que se encontra ancorado à membrana plasmática e se estende através da camada de péptidoglicanos até ao exterior da célula. O LAM suprime a ativação dos macrófagos e a estimulação das células-T, sendo também considerado responsável pelo papel de adjuvante na indução da libertação de TNF (fator de necrose tumoral)¹¹.

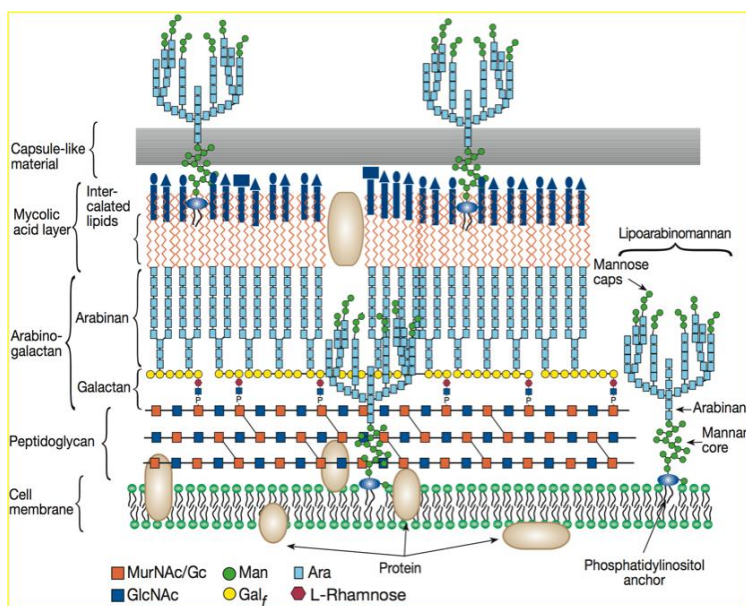


Figura 3: Composição da parede de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*¹³.

Segundo Walters W. R. *et al.* 2003, sugerem que a micobactéria pode invadir o hospedeiro numa primeira fase pela mucosa oral e amígdalas. Após a entrada através das amígdalas, o *M. paratuberculosis* dispersa-se pelos nódulos linfáticos mesentéricos e o ílio através da corrente sanguínea¹¹.

O epitélio intestinal atua como uma barreira primária contra os agentes patogénicos através de mecanismos inatos como *glycocalyx*, *tight junctions* e produção de péptidos com atividade antimicrobiana. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* é um agente patogénico adepto de contornar estas barreiras e estabelecer uma infeção crónica no hospedeiro¹⁴.

Após a ingestão o *M. paratuberculosis* é transportado ao longo do trato gastrointestinal até alcançar a mucosa intestinal. Aqui este agente patogénico tem a capacidade de entrar em dois tipos celulares de modo a iniciar a infeção: *Microfold cells* (células M) e enterócitos. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* é idêntico a outros agentes patogénicos enteroinvasivos que tomam partido das células especializadas antígeno-sampling presentes nas placas de Peyer no intestino¹¹.

As células M estão localizadas no epitélio folicular associado das placas de Peyer. Demonstram integrinas β 1 com elevada densidade, e é postulado que estas integrinas possam servir como alvo para *M. paratuberculosis*¹¹.

O período crítico da infeção por *M. paratuberculosis* pode ser dividido em duas etapas 1) invasão do intestino, e 2) infeção e sobrevivência nos macrófagos. Em cada fase o agente patogénico enfrenta uma série de defesas do sistema do hospedeiro até conseguir estabelecer a infeção¹¹.

A passagem da micobactéria pelo sistema digestivo do ruminante ativa a proteína ligada à parede celular da bactéria denominada FAP (fibronectin attachment protein) para promover a opsonização pela fibronectina. FAP liga por sua vez *M. paratuberculosis* à superfície do lúmen intestinal das células M através dos receptores de fibronectina. Este mecanismo contribui para a captura preferencial de MAP pelas células M que são enriquecidas pelos receptores de fibronectina¹¹.

M. paratuberculosis interagem com as células M através da ponte de fibronectina. A bactéria (azul) são capturadas pelas células M, onde podem ser apanhadas pelas células dendríticas (roxo), onde os enterócitos intestinais e células M com invaginação basolateral, ou os macrófagos (branco) e levar até aos linfonodos mesentéricos ou outros linfonodos regionais. Nos enterócitos, a bactéria capturada é levada pelo mecanismo Cdc42-RhoA para um vacuolo endossomal que se torna acidificado (vacuolo a vermelho). Esta situação faz sinalizar a produção de IL-1 β que atrai macrófagos subepiteliais. *M. paratuberculosis* rompe as vias de comunicação celular pela quebra das *tight junctions*, e portanto o agente patogénico pode também escapar entre os enterócitos e ter acesso à lâmina própria (metade inferior da figura). Núcleos das células epiteliais são mostrados a verde (figura 4)¹⁴.

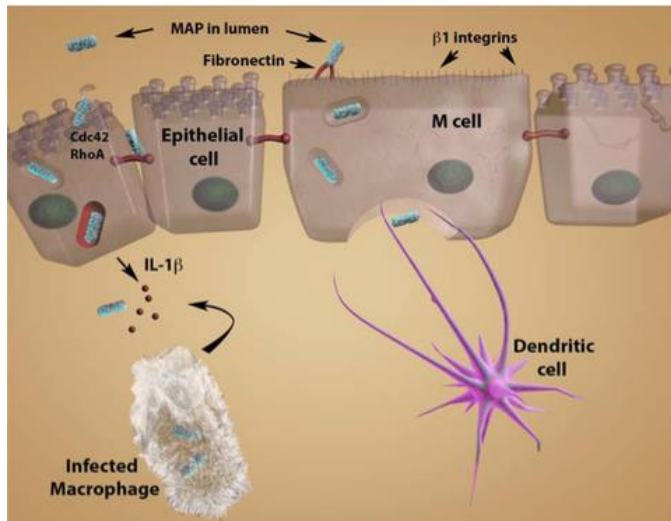


Figura 4: Eventos iniciais de infecção por *M. paratuberculosis*¹⁴.

Após a penetração da barreira intestinal, o *M. paratuberculosis* invade os macrófagos subepiteliais dos quais possuem diversas famílias de receptores envolvidos na captura de micobactérias: receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4), receptores de imunoglobulina (FCR), receptores de manose e receptores scavenger¹¹.

A invasão da primeira barreira celular do hospedeiro ocorre após 30 minutos do seu contacto com o agente¹¹

Um dos períodos mais críticos no estabelecimento da infecção de forma persistente dos macrófagos ocorre logo após a entrada de *M. paratuberculosis* no fagossoma. Após a formação do fagossoma ocorre a fusão destes com os lisossomas dando origem aos fagolisossomas que possuem mecanismos líticos que levariam à destruição do *M. paratuberculosis*¹¹. No entanto o *M. paratuberculosis* possui mecanismos que impedem a sua destruição nos fagolisossomas. Um dos mecanismos melhor conhecido diz respeito ao impedimento da acidificação do vacuolo. *M. paratuberculosis* secreta uma proteína fosfatase de tirosina (PtpA) para o conteúdo vesicular, a qual se vai ligar a uma subunidade específica da bomba/transportador V-ATPase da membrana do macrófago responsável pela acidificação do lúmen. PtpA ao ligar-se à V-ATPase, medeia a desforilação de VPS33B resultando na exclusão de V-ATPase do fagossoma, impedindo desta forma a acidificação deste compartimento.

Existem outros mecanismos de inibição da destruição de *M. paratuberculosis*. Os sulfolípidos de *M. paratuberculosis* inibem a formação do fagossoma com o lisossoma. SapM desfosforila os fosfatos de fosfatidilinositol, rompendo a regulação de captura membranar. V-ATPase está envolvida na fusão do fagossoma-lisossoma. Esta ligação pela proteína PtpA da micobactéria e a exclusão do fagossoma inibe a fusão do fagossoma. Rab5 estimula a fusão dos endossomas primários. Pela retenção de Rab5, bem como a inibição do recrutamento do

autoantígeno 1 (EEA1) para os fagossomas micobacterianos, *M. paratuberculosis* é capaz de prevenir a maturação do endossoma dentro dos compartimentos funcionais micobacteriocidais. Normalmente TACO é libertado do fagossoma, permitindo a fusão com o lisossoma. Esta libertação é inibida por *M. paratuberculosis*. Estes agentes bacterianos são conhecidos pela influência de MAPK-p38 pela ativação de TLR2 através de LAM. Esta situação provoca a inibição de EEA1, TLR2 e induz a produção de IL-10 inibindo outras vias de sinalização de imunidade inata¹¹. A sinalização de MAPK-p38 bloqueia a associação de EEA1 e LAMP-3 com os late endossomas, onde o bloqueio da sinalização de MAPK-p38 causa a acidificação fagossomal¹¹.

A maturação dos endossomas necessita de um leque de proteínas que incluem ATPase, NSF (N-ethylmaleide sensitive factor) SNAPs, SNARES e vesículas são essenciais para a maturação e fusão dos endossomas. Este processo é regulado por Rab GTPases; Rab5 promove a fusão dos fagossomas maduros com os endossomas e lisossomas. Através do impedimento de Rab5 e a inibição do recrutamento de EEA1 (early endosomal autoantigen 1) para os fagossomas, *M. paratuberculosis* é capaz de reverter a maturação do endossoma em compartimentos funcionais. Por fim, outro mecanismo é a impedição da libertação de TACO fagossoma, incluindo a fusão com o lisossoma (figura 5)¹¹.

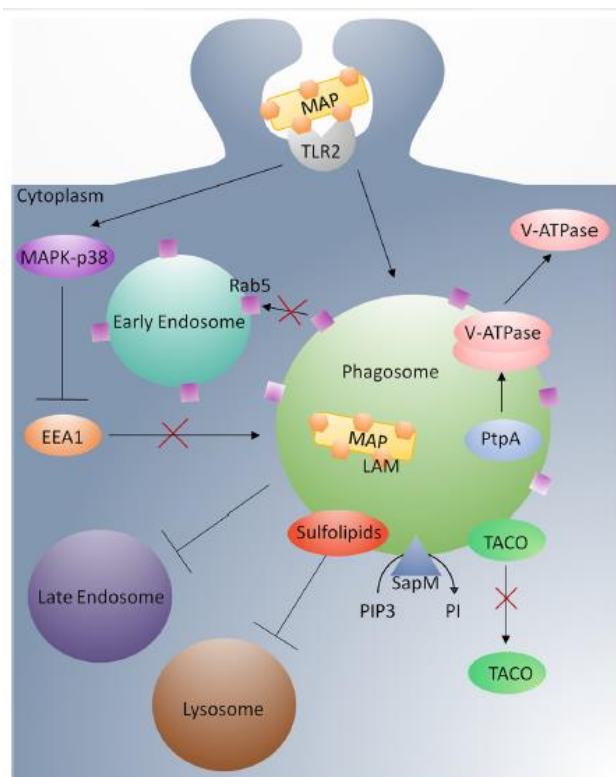


Figura 5: Inibição da maturação fagossomal por *M. paratuberculosis*¹¹.

Bloqueio da resposta dos macrófagos

Os receptores de padrões de reconhecimento (PRR) são responsáveis pela recepção da micobactéria e a evasão subsequente de respostas proteicas do hospedeiro. A ativação destes receptores ocorre pela ligação a PAMPs (padrões de associação molecular de agentes patogénicos). Os TLR representam a maior subcategoria de PRR¹¹.

A sinalização de TLR9 é redirecionada por *M. paratuberculosis* para proceder através do mecanismo mediador de Pyk2. Isto funciona como vantagem para o patogene pela geração de fatores intramoleculares favoráveis à micobactéria¹¹.

TLR2 tem sido implicado no redirecionamento de micobactérias através da ligação das lipoproteínas da parede celular da bactéria. É então ativado por Man-LAM (*Mannosylated lipoarabinomannam*) que inicia a sinalização pela via MAPK-p38. Este é o primeiro mecanismo pelo qual *M. paratuberculosis* suprime as respostas antimicrobianas dos macrófagos. Man-LAM reduz também a expressão de TNF e IL-12. Tem sido implicado também na inibição de INF induzido pela ativação do macrófago e a indução de TGF¹¹.

A sinalização de interferão gamma tem um papel principal nas defesas e resposta imune contra agentes patogénicos. A infeção MAP aumenta a expressão de genes SOCS 1 e 3, reguladores negativos de receptores IFG, assim como o decréscimo da expressão de genes receptores de cadeia IFN 1 e 2¹¹.

Paratuberculose tem um papel essencial na disrupção da via de sinalização do receptor IFN tanto por desfosforilação ou pelo receptor por si próprio¹¹.

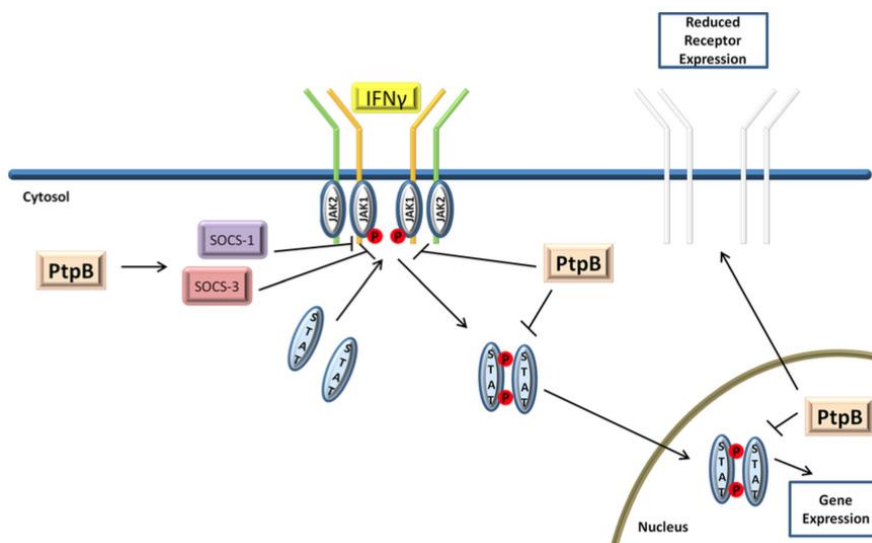


Figura 6: Inibição da sinalização de IFN por MAP¹¹.

Na figura 7 podemos observar que a infecção pela *M. paratuberculosis* inibe a sinalização JAK-STAT pelo aumento de expressão de reguladores negativos do receptor IFN, SOC1 e SOC3, bem como o decréscimo na expressão das cadeias 1 e 2 do receptor IFN. Estas modificações na resposta celular ocorrem de forma temporal em que primeiro, existe a indução de SOC1 e 3 com a subsequente repressão do receptor IFN. A inibição da resposta por IFN pode ser mediada pela molécula executora de *M. paratuberculosis*¹¹.

Da perspectiva do hospedeiro a apoptose das células infetadas serve como limpeza do agente patogénico. As células imunes infectadas por *M. paratuberculosis* que passa por apoptose são fagocitadas por macrófagos saudáveis, dando ao sistema imunitário do hospedeiro a oportunidade de poder limitar o crescimento de *M. paratuberculosis*. Contudo este processo revela também a oportunidade da micobactéria se espalhar pelos macrófagos saudáveis. A apoptose dos macrófagos infetados também limita a infecção aguda e dano tecidual que ocorre tipicamente com a libertação de moléculas quimiotáticas seguida pela lise celular.¹¹

2. OBJETIVOS

Os mecanismos que permitem o funcionamento dos sistemas biológicos envolvem processos moleculares complexos. Para esclarecer esta complexidade a criação de instrumentos que integrem todo o conhecimento existente nomeadamente a informação sobre as proteínas implicadas em condições fisiológicas e também em condições decorrentes de alterações patológicas, contribuem para esclarecer os mecanismos de patogénese.

A ovelha é um animal de grande importância social e económica na região de Viseu.

A transferência do conhecimento científico decorrente da evolução dos dados obtidos pelas técnicas de proteómica aplicadas a *Ovis aries*, constitui uma oportunidade para o desenvolvimento de aplicações que possam contribuir para o melhoramento da qualidade de vida do animal, como também contribuem para o aumento da rentabilidade das indústrias que utilizam como matéria-prima a ovelha ou seus produtos.

O presente trabalho tem por objectivo construir um repositório de toda a informação publicada sobre proteínas identificadas em *Ovis aries*, visando a construção de uma base informativa para o desenvolvimento do diagnóstico molecular e para apoio a estudos de desenvolvimento de soluções terapêuticas.

A pesquisa, organização e integração da informação foi conduzida cumprindo os seguintes objectivos específicos:

1. Revisão bibliográfica, compilação e anotação das proteínas identificadas em *Ovis aries*;
2. Integração da informação numa base de dados - o OvisOme;
3. Caracterização do proteoma oral nomeadamente a identificação dos processos biológicos em que participam as proteínas depositadas no OvisOme;
4. Identificação de proteínas da saliva como possíveis biomarcadores;
5. Estabelecimento das metodologias de colheita e armazenamento das amostras de saliva de ovelhas Serra da Estrela;
6. Distinção dos perfis de proteínas das amostras de saliva.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo teve como ponto de partida a compilação da informação relativa aos proteomas parciais de ovelha numa base de dados, o OvisOme. Com a informação depositada e organizada foi realizada uma caracterização ‘*in silico*’ do proteoma de *Ovis aries* com especial incidência na identificação das proteínas implicadas em patologias visando a aplicação deste conhecimento no desenvolvimento de diagnóstico a partir da saliva.

Apresentamos nesta secção as metodologias utilizadas para a criação e respetiva consulta da base de dados dedicada ao proteoma da ovelha – o OvisOme.

O fluxograma da figura 7 representa a metodologia seguida neste trabalho.

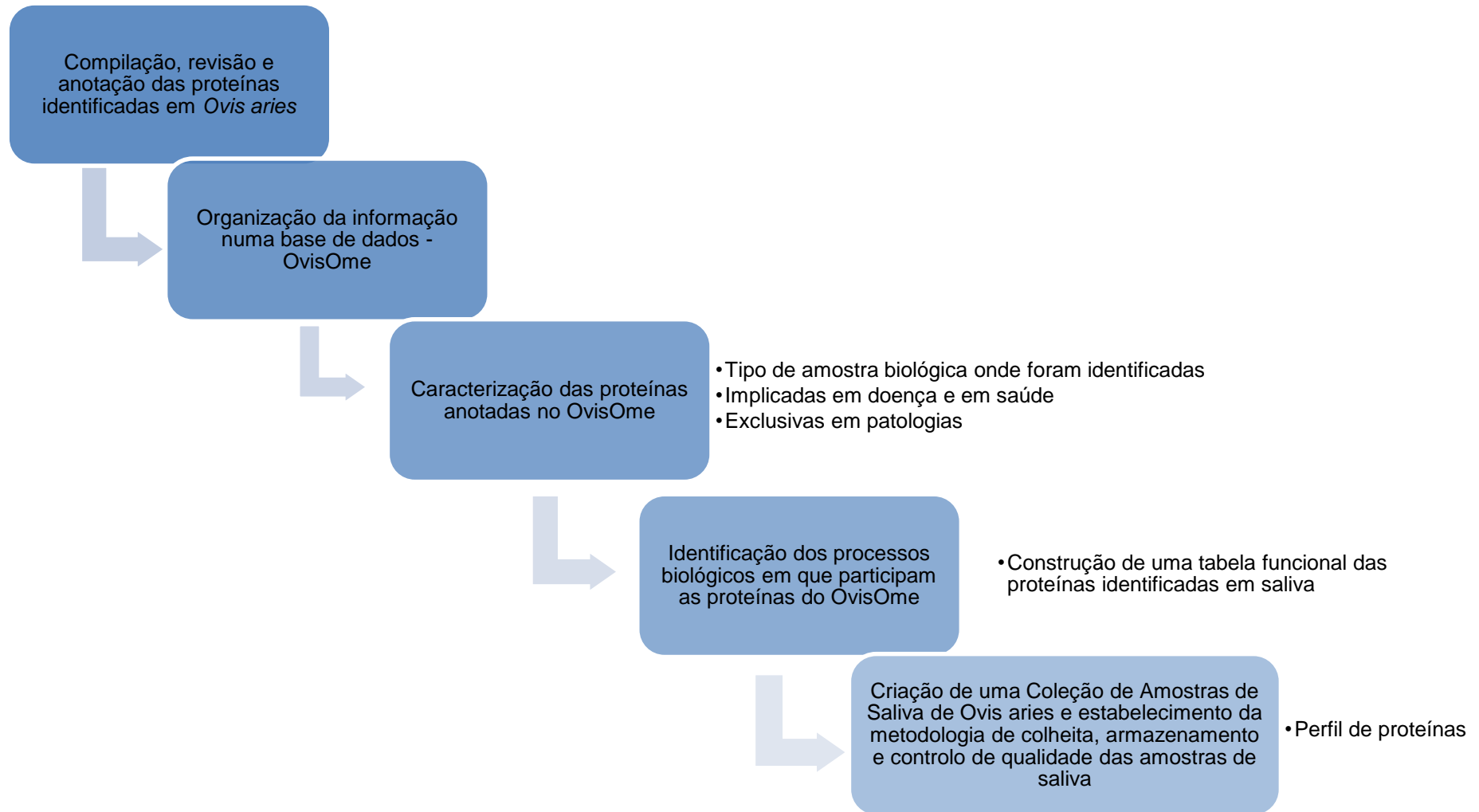


Figura 7: Fluxograma ilustrando a estratégia de desenvolvimento utilizada para a realização do trabalho.

3.1 DA COMPILAÇÃO DOS PROTEOMAS À CRIAÇÃO DA BASE DE DADOS OVISOME

A pesquisa bibliográfica foi realizada com o auxílio do motor de pesquisa NCBI – PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced>). PubMed é um recurso livre desenvolvido e mantido pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI). Esta plataforma compreende mais de 24 milhões de citações para a literatura biomédica.

Para a pesquisa bibliográfica foram utilizadas inicialmente como palavras-chave na janela de pesquisa avançada: “*sheep AND saliva*”; “*sheep AND salivary*” e “*sheep AND oral cavity*” (figura 8).

PubMed Advanced Search Builder

(sheep[Title/Abstract] AND saliva[Title/Abstract])

Edit

Builder

Title/Abstract sheep

AND Title/Abstract saliva

AND All Fields

Search or Add to history

Figura 8: Pesquisa avançada NCBI PubMed utilizando como palavra-chave “sheep AND saliva”.

Contudo não foi uma tentativa bem-sucedida. Foi identificado apenas um artigo científico correspondente aos termos da pesquisa.

Decidiu-se alargar os termos de pesquisa e retirar os termos “saliva”, “salivary” e “oral cavity” uma vez que são restritivos apenas para este fluido biológico e localização. Como está representado na figura 9, a pesquisa passou a ter os termos “*sheep AND proteom**”.

PubMed Advanced Search Builder

(sheep[Title/Abstract] AND proteom*[Title/Abstract])

Edit

Builder

Title/Abstract sheep

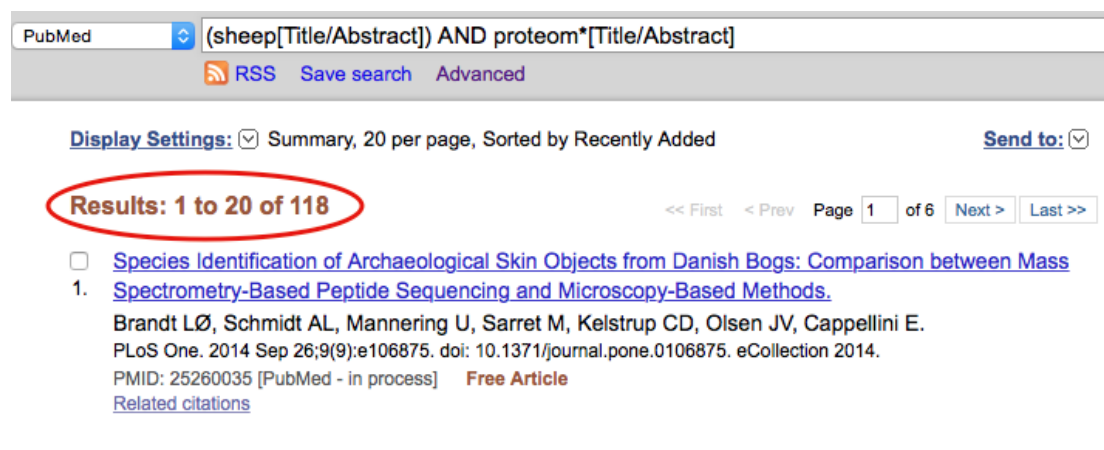
AND Title/Abstract proteom*

AND All Fields

Search or Add to history

Figura 9: Pesquisa avançada PubMed utilizando as palavras-chave “sheep” e “proteom*”.

A palavra-chave “proteom*” foi escolhida para que os resultados da pesquisa pudessem abrangessem palavras como proteoma, proteína ou complexo proteico. A pesquisa resultou em 118 publicações até Fevereiro de 2014 (figura 10).



PubMed (sheep[Title/Abstract]) AND proteom*[Title/Abstract]

RSS Save search Advanced

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Recently Added Send to:

Results: 1 to 20 of 118 << First < Prev Page 1 of 6 Next > Last >>

[Species Identification of Archaeological Skin Objects from Danish Bogs: Comparison between Mass Spectrometry-Based Peptide Sequencing and Microscopy-Based Methods.](#)

1. Brandt LØ, Schmidt AL, Mannering U, Sarret M, Kelstrup CD, Olsen JV, Cappellini E. PLoS One. 2014 Sep 26;9(9):e106875. doi: 10.1371/journal.pone.0106875. eCollection 2014. PMID: 25260035 [PubMed - in process] **Free Article** [Related citations](#)

Figura 10: Resultados da pesquisa avançada PubMed utilizando como palavras-chave. “sheep” e “proteom*”.

O número elevado de resultados tornou necessário encontrar uma solução para a análise ser feita de forma rápida e principalmente correta, dado que entre estes 118 artigos científicos alguns podem apresentar as palavras-chave no texto ou no título mas não são estudos que tenham realmente resultados de proteômica, por essa razão recorreu-se à ferramenta bioinformática BECAS.

A ferramenta BECAS – biomedical concept identification – é uma aplicação Web desenvolvida pelo grupo de bioinformática da Universidade de Aveiro, que oferece apoio a investigadores e profissionais de saúde na identificação de mais de 1,200,000 conceitos biomédicos em referências PubMed. A sua função é a identificação de grupos semânticos, proporcionando nomes preferenciais e enriquecendo-os com referências a recursos públicos como é o caso da base de dados UniProt.

A primeira etapa para efetuar a análise com a BECAS é obter o código identificador do artigo, PubMed ID. O passo seguinte é colocar na barra de pesquisa na plataforma BECAS. Estas etapas estão representadas pelas Figuras 11 e 12.

Sheep and goat saliva proteome analysis: a useful tool for ingestive behavior research?

Lamy E¹, da Costa G, Santos R, Capela E, Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales Baptista E.

Author information

Abstract

Sheep and goats differ in diet selection, which may reflect different abilities to deal with the ingestion of plant secondary metabolites. Although saliva provides a basis for immediate oral information via sensory cues and also a mechanism for detoxification, our understanding of the role of saliva in the pre-gastric control of the intake of herbivores is rudimentary. Salivary proteins have important biological functions, but despite their significance, their expression patterns in sheep and goats have been little studied. Protein separation techniques coupled to mass spectrometry based techniques have been used to obtain an extensive comprehension of human saliva protein composition but far fewer studies have been undertaken on animals' saliva. We used two-dimensional electrophoresis gel analysis to compare sheep and goats parotid saliva proteome. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were used to identify proteins. From a total of 260 sheep and 205 goat saliva protein spots, 117 and 106 were identified, respectively. A high proportion of serum proteins were found in both salivary protein profiles. Major differences between the two species were detected for proteins within the range of 25-35 kDa. This study presents the parotid saliva proteome of sheep and goat and highlights the potential of proteomics for investigation relating to intake behavior research.

PMID: 19615390 [PubMed] - indexed for MEDLINE

Figura 11: Exemplo de seleção do PubMed ID – artigos resultantes da pesquisa avançada PubMed para análise na plataforma BECAS.

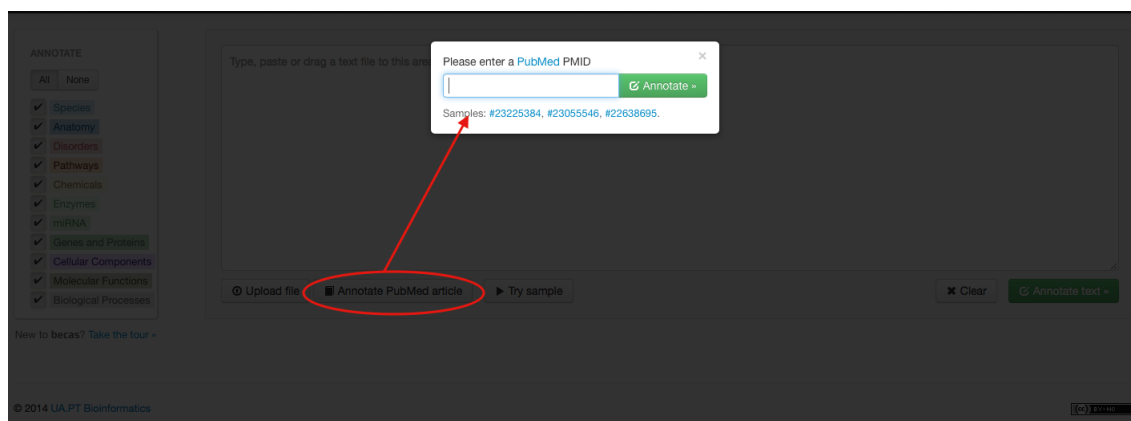


Figura 12: Inclusão do código PubMed no local de anotação da plataforma BECAS.

A análise inicial dos 118 artigos foi efetuada com recurso aos termos biomédicos que são avaliados pela ferramenta BECAS. Estes termos estão divididos por cores e por grupos como por exemplo: 'Disorders', 'Anatomy' entre outros (figura 13). A ferramenta BECAS para cada artigo anota com cores distintas os grupos de termos biomédicos, facilitando desta forma a identificação dos termos importantes para o estudo em questão.

b2cas Annotate Help API Widget About Contact

HIGHLIGHT

All None

- Species
- Anatomy
- Disorders
- Chemicals
- Cellular Components
- Biological Processes
- Ambiguous

New to becas? [Take the tour »](#)

Sheep and goat saliva proteome analysis: a useful tool for ingestive behavior research?

Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela E Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales Baptista E [PT]
Physiol. Behav. 2009 Oct 19. 10.1016/j.physbeh.2009.07.002
 Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't

Sheep and goats differ in diet selection, which may reflect different abilities to deal with the ingestion of plant secondary metabolites. Although saliva provides a basis for immediate oral information via sensory cues and also a mechanism for detoxification, our understanding of the role of saliva in the pre-gastric control of the intake of herbivores is rudimentary. Salivary proteins have important biological functions, but despite their significance, their expression patterns in sheep and goats have been little studied. Protein separation techniques coupled to mass spectrometry based techniques have been used to obtain an extensive comprehension of human saliva protein composition but far fewer studies have been undertaken on animals' saliva. We used two-dimensional electrophoresis gel analysis to compare sheep and goats parotid saliva proteome. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were used to identify proteins. From a total of 260 sheep and 205 goat saliva protein spots, 117 and 106 were identified, respectively. A high proportion of serum proteins were found in both salivary protein profiles. Major differences between the two species were detected for proteins within the range of 25-35 kDa. This study presents the parotid saliva proteome of sheep and goat and highlights the potential of proteomics for investigation relating to intake behavior research.

Annotated 41 concept occurrences in 0.789s.

Figura 13: Resultados da ferramenta BECAS para análise – Cores diferentes para cada grupo de termos biomédicos inseridos na plataforma.

3.1.1 OVISOME: ANOTAÇÃO DO PROTEOMA DE OVIS ARIES

A criação e construção da base de dados OvisOme surgiu dentro do grupo de investigação, com o objetivo de solucionar a dispersão dos estudos do proteoma de ovino, e organizar toda a informação numa ferramenta que englobe o proteoma parcial em estudo, à semelhança do trabalho executado por N. Rosa *et al.* 2012¹⁵.

As principais divergências entre os trabalhos assentam em dois pontos principais: os organismos que estudam e o tipo de amostras biológicas. A base de dados OvisOme é constituída por proteomas parciais estudados no organismo ovino enquanto que a base de dados OralOme apenas estuda a cavidade oral humana.

Os campos das base de dados são como guias para o preenchimento dos dados e servem como orientação para o estudo dos mesmos.

Podemos ter uma visão global dos campos das duas bases de dados na tabela 1. São bastante semelhantes, com exceção de algumas colunas que divergem pelas razões que vamos apresentar a baixo.

Tabela 1: Campos e termos da base de dados OralOme e OvisOme – Construção do endereço de informação. Campos iguais estão anotados com o símbolo ✓ e os campos distintos ou inexistentes com o símbolo ✗.

OralOme	Alterações	OvisOme
UniProtKBAC	✓	UniProtKBAC
Name	✓	Name
Organism	✗	Whole Saliva
Parotid	✗	Cerebrospinal fluid
Parotid Exosome	✗	Milk
SM/SL	✗	Wool
Minor	✗	Seminal Plasma
Whole Saliva	✗	Serum
Crevicular Fluid	✗	Muscle
Mucosa	✗	Mammary tissue
Tongue	✗	Linfa
	✗	Urina
	✗	Lágrima
	✗	Fluido biliar
<i>'in vitro'</i>	✗	
Health	✓	Health
Disease (OMIM ID)	✗	Disease
Disease (MeSH ID)	✓	Disease (MeSH ID)
	✗	Disease name
	✗	Microrganism
Regulation	✓	Regulation
Age group	✓	Breed
Gender	✓	Age group
Social Habits	✗	Gender
Methods of Sampling	✓	Methods of Sampling
Methods of Analysis	✓	Methods of Analysis
Type of Study	✓	Type of Study
PTM	✗	
Biomarker	✓	Biomarker

Citation (NCBI ID)	✓	Citation (NCBI ID)
Obs.	✓	Obs.

Para a construção do OvisOme recorreu-se à utilização da língua inglesa para que a base de dados possa ser disponibilizada futuramente a toda a comunidade científica internacional.

Toda a informação introduzida na base de dados OvisOme resulta de duas formas de apontamento: anotação manual através da plataforma NCBI-PubMed e da anotação de proteínas revistas identificadas no UniProt¹⁶.

O procedimento de anotação manual está descrito em baixo de forma detalhada.

O primeiro passo consiste na obtenção de dados de proteómica apresentados pela bibliografia obtida a partir da consulta pela plataforma NCBI-PubMed. De seguida é necessário compreender os resultados do estudo e preencher o OvisOme com os dados dos resultados do artigo.

Inicialmente começou-se por inserir no campo “*UniProtKBAC*” os respetivos códigos UniProt e no campo “*Protein name*” o nome referente a cada proteína. No campo “*Organism*” inseriu-se o nome científico do organismo, *Ovis aries*, uma vez que se trata de amostras de ovelha (figura 14).

Sheep and goat saliva proteome analysis: A useful tool for ingestive behavior research?

E. Lamy^a, G. da Costa^b, R. Santos^b, F. Capela e Silva^{a,c}, J. Potes^{d,e}, A. Pereira^{a,f}, A.V. Coelho^{b,g,*}, E. Sales Baptista^{a,f,*}

P12725 - A1AT_SHEEP

Protein | **Alpha-1-antiproteinase**

Gene | N/A

Organism | *Ovis aries* (Sheep)

Status | Reviewed - - Experi

Display | None

BLAST | Align | Format

Protein	Accession code ^a
Actin cytoplasmic 1	P60713
Alpha-1-antiproteinase precursor	P12725
Annexin A1	P46193
Apolipoprotein A1 precursor	P15497
Carbonic anhydrase VI	P08060
Catalase	P00432
Cathelicidin-1 precursor	P54230

UniProtKB AC	Name	Organism
P12725	Alpha-1-antiproteinase precursor	<i>Ovis aries</i>

Figura 14: Catalogação das proteínas anotadas na base de dados OvisOme: título do artigo e respetivas proteínas identificadas; Códigos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e em que organismo estão presentes. Catalogação manual da base de dados OvisOme.

No momento seguinte anotou-se o tipo de amostras em que foram identificadas as proteínas, que neste caso pertencem a saliva, colocando-se uma cruz (x) na coluna correspondente ao “*Whole Saliva*”. O artigo referiu que o estudo foi efetuado em fêmeas saudáveis, em que os animais já tinham chegado à idade adulta. Foram descritos os tipos de metodologias usadas para a recolha da saliva e a sua posterior análise. É um tipo de estudo de proteómica dado que usa a técnica de espectrometria de massa para analisar as amostras de saliva e identificar as proteínas aí presentes. Por fim foi anotado o código PubMed em que foi recolhida esta informação (figura 15).

Health	Disease (MeSH ID)	Regulation	Breed	Age group	Gender	Methods of Sampling**	Methods of Analysis***	Type of Study	Citation (NCBI ID)	Biomarker	Obs.
x				Adult	F	collected through	Quantification of Proteomic		19615390		

Figura 15: Anotação das características do organismo, como a idade, género, condição em que foi identificada as proteína (saúde/patologia), os métodos de recolha e análise, o tipo de estudo e a citação.

A maioria dos artigos apresenta as proteínas que identificaram no estudo sob forma de tabela, (figura 16) que integra o corpo do artigo. Outros artigos apresentam a informação como anexo do artigo e em casos mais raros as tabelas das proteínas identificadas são fornecidas como material suplementar que tem que ser solicitado aos autores.

Protein	Accession code ^a
Actin cytoplasmic 1	P60713
Alpha-1-antiproteinase precursor	P12725
Annexin A1	P46193
Apolipoprotein A1 precursor	P15497
Carbonic anhydrase VI	P08060
Catalase	P00432
Cathelicidin-1 precursor	P54230

Figura 16: Exemplo de tabela descritiva de proteínas identificadas em saliva (Lamy *et al.* 2009).

Verificou-se que por vezes as proteínas presentes nas tabelas são descritas como pertencentes ao organismo *Ovis aries*, mas o código apresentado corresponde a outro organismo. Nestas situações foi necessário recorrer à base de dados UniProt¹⁶ para rever os códigos e os nomes das proteínas aplicando o procedimento de revisão manual. A pesquisa é efetuada na plataforma UniProt com o código da proteína. A figura 17 ilustra os resultados obtidos com a utilização de um código incorreto, pois corresponde ao organismo *Bos taurus* e não *Ovis aries*. Nestes casos foi necessário recorrer ao algoritmo 'blast', que permite comparar sequências primárias de proteínas. Os códigos UniProt referentes às proteínas identificadas nos artigos são conferidos na base de dados UniProt. Quando o código não corresponde ao organismo em que a proteína realmente foi identificada é preciso usar a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Esta ferramenta é usada para procurar regiões com similaridade local entre as sequências alinhadas. Os resultados são ordenados de acordo com a identidade entre as sequências. A maior percentagem corresponde à proteína mais semelhante / homóloga. Ao fazer uso desta função podemos encontrar a proteína mais idêntica à apresentada na pesquisa. Assim conseguimos obter com fiabilidade a proteína correspondente em ovino. A sequência está representada na figura 18.

Protein	Accession code ^a
Actin cytoplasmic 1	P60713
Alpha-1-antitrypsin precursor	P12725
Annexin A1	P46193
Apolipoprotein A1 precursor	P15497
Carbonic anhydrase VI	P08060
Catalase	P00432
Cathelicidin-1 precursor	P54230




Figura 17: Procedimento para a revisão manual da informação sobre as proteínas.

P46193 - ANXA1_BOVIN

1) **Protein** | **Annexin A1**
Gene | **ANXA1, ANX1**
Organism | **Bos taurus (Bovine)**
Status | **Reviewed - ●●●●●●**

Display | **None** | **BLAST** | **Align** | **F**

Function
Calcium/phospholipid-binding
bind from two to four calcium

2)

BLAST

Filter byⁱ

- Reviewed (31)
- Unreviewed (219)
- With 3D structure (6)
- Proteomes (148)
- Organisms
 - Human (11)
 - Mouse (15)
 - Zebrafish (9)
 - Rat (5)
 - Zebrafish (9)
 - Rat (5)
 - Bovine (4)
 - Other organisms
 - Ovis aries [9940]** Go

3)

Overview

Entry	Protein names	Match hit	Identity
P46193	Annexin A1 (Bos taurus)	████████████████████	100.0%
F1N650	Annexin (Bos taurus)	████████████████████	99.0%
L8J3G6	Annexin (Bos mutus)	████████████████████	99.0%
I6YIV1	Annexin (Bos taurus)	████████████████████	99.0%

4)

5)

Overview

Show all 250

Entry	Protein names	Match hit	Identity
P46193	Annexin A1 (Bos taurus)	████████████████████	100.0%
F1N650	Annexin (Bos taurus)	████████████████████	99.0%
L8J3G6	Annexin (Bos mutus)	████████████████████	99.0%
I6YIV1	Annexin (Bos taurus)	████████████████████	99.0%
W5PSZ5	Annexin (Ovis aries)	████████████████████	99.0%

W5PSZ5 - W5PSZ5_SHEEP

5) **Protein** | **Annexin**
Gene | **ANXA1**
Organism | **Ovis aries (Sheep)**
Status | **Unreviewed - ●●●●●● - Protein inferred from homologyⁱ**

Display | **None** | **BLAST** | **Align** | **Format** | **Add to basket** | **History**

Functionⁱ

Figura 18: Sequência de obtenção do código UniProt – BLAST. 1) Proteína identificada como outro organismo; 2) alinhamento local através da ferramenta BLAST no UniProt; 3) pesquisa da proteína mais idêntica à proteína inicial mas pertencente ao organismo *Ovis aries*; 4) escolha da proteína com a identidade mais próxima de 100% que indica o grau de homologia entre as proteínas; 5) resultado final depois da escolha da proteína pela identidade agora com o código correspondente ao organismo *Ovis aries*.

3.1.2 OVISOME: CONSTRUÇÃO DA BASE DE DADOS

O ponto de partida para o preenchimento ou consulta da base de dados OvisOme, consiste no código identificador da proteína, seguido do nome da mesma e do nome do organismo em que a proteína foi identificada, seguindo-se a informação sobre o tipo de amostras em que foram identificadas as proteínas. Para cada proteína é também indicada a idade e género de cada individuo dador da amostra, bem como a condição do individuo em termos de saúde (saudável ou com alguma patologia) e a regulação da proteína se está aumentada ou diminuída.

O segundo bloco de termos remetem para o tipo de amostra biológica onde foi estudada a proteína, incluindo primeiramente as amostras de fluidos (saliva, soro, fluido cerebrospinal, leite, plasma seminal, linfa, fluido biliar, lágrima e urina) e seguindo-se os tecidos (lã, biopsias em músculo e tecido mamário), sendo estes componentes de caracterização identificados com uma cruz na coluna correspondente a cada termo (cabeçalho da coluna). A adição de novos termos no OvisOme resultam do facto desta base de dados conter os proteomas parciais de 12 tipos de amostras diferentes.

A anotação das proteínas que foram identificadas em dadores saudáveis ou em caso de dadores com patologia e os termos referentes ao estado de regulação da proteína (aumentada/diminuída em relação ao estado de saúde) são também anotados com uma cruz. A anotação relativa ao tipo de doença é realizada utilizando o MeSH ID. Esta ferramenta também denominada 'Medical Subject Headings' é um sistema de meta-dados em língua inglesa dizendo respeito à nomenclatura e baseando-se na indexação de artigos no campo das ciências da saúde. É um sistema apoiado pelo sistema MEDLINE-PubMed.

Seguidamente a caracterização do organismo e termos de raça é essencial para futuramente poder associar determinada proteína a uma determinada espécie.

Os dados das colunas espécie, idade e género, caracterizam os animais que entraram no estudo. A coluna espécie está presente no OvisOme para que no futuro os estudos possam incluir a identificação de proteínas bacterianas identificadas em amostras de *Ovis aries*.

No OvisOme estão também registados os métodos que foram utilizados para identificar cada proteína (tipo de estudo) e se a proteína foi proposta como biomarcador. Por fim os três últimos cabeçalhos remetem para o respetivo ano em que o artigo foi publicado, a sua identificação no NCBI e as observações relevantes que constem no artigo, que não configurem a informação relativa à anotada nos outros cabeçalhos (como por exemplo o artigo ser de revisão). Apenas o cabeçalho "*Biomarker*" é anotado com uma cruz, os restantes são descritivos.

Na base de dados OvisOme não existem 3 colunas que estão presentes na base de dados OralOme, nomeadamente as colunas referentes ao código de doença OMIM, hábitos

sociais e modificações pós-tradução. O motivo da ausência da coluna PTM é devido à inexistência de artigos com informações relativas a modificações pós-tradução.

A anotação automática levada a cabo pelas proteínas revistas de ovelha é efetuada pela Swiss-Prot (Figura 19, retângulo roxo). Esta é uma secção do UniProt que reúne sequências de proteínas não redundantes, decorrentes de resultados experimentais, recursos de computadores e conclusões científicas. Esta anotação permite aumentar o conhecimento do proteoma de ovelha a partir da informação de proteínas presentes em patologias (circulo vermelho). Com a recolha e compilação dos proteomas parciais, o número de proteínas anotadas de acordo com este procedimento vai decrescer, já que a anotação manual é mais completa e rigorosa para os estudos nesta área (figura 19).

Entry	Entry name	Protein names	Organism	Involvement in disease	PubMed ID	Mapped PubMed ID
P05979	PGH1_SHEEP	Prostaglandin G/H synthase 1 (EC 1.14.99.1) (Cyclooxygenase-1) (COX-1) (Prostaglandin H2 synthase 1) (PGH synthase 1) (PGHS-1)	Ovis aries (Sheep)		3125548; 3129310; 2831188; 6414516; 2108169;	11477109 PDB:1GX; PDB:1IGZ; 11723249 PDB:1EBV; 14672659 PDB:1Q4G;

Figura 19: Proteínas revistas pela secção Swiss-Prot no organismo *Ovis aries*. Anotação automática das proteínas revistas no OvisOme.

3.1.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM SALIVA DE OVELHA E PROTEÍNAS EXCLUSIVAS EM SITUAÇÃO DE DOENÇA

As proteínas exclusivas identificadas em situação de doença foram posteriormente alvo de uma caracterização funcional fazendo o recurso a termos ontológicos que caracterizam os processos biológicos em que participam. A organização dessa informação permite a construção de tabelas funcionais que facilitam a interpretação de resultados.

As ontologias foram retiradas com o auxílio da plataforma AgBase. Esta plataforma permite a identificação das ontologias em que participam as proteínas. Para isso recorremos a duas ferramentas proporcionadas pela Universidade do Estado de Mississippi nesta plataforma: *GORetriver* e *GOSlim Viewer*, assinaladas a vermelho na figura 20.



Figura 20: Plataforma AgBase – Ferramentas GO Retriever e GO Slim Viewer assinaladas a vermelho. Figura adaptada no portal Web Agbase.

O procedimento para a identificação das ontologias decorre em dois passos. No primeiro passo submetemos os códigos identificadores UniProt no formato de texto para a ferramenta Go Retriever. Começamos por selecionar a partir do OvisOme os códigos de cada proteína e exportaram-se os códigos para um novo Excel guardado num formato “text” (tab delimited). O formato “text” das proteínas da saliva foi usado na ferramenta bioinformática “Go Retriever” que permite saber rapidamente quais as anotações GO existentes para um conjunto de dados experimentais, tendo o cuidado de escolher a opção “UniProt ID” na seção “Accession Type” como está demonstrado na figura 21.

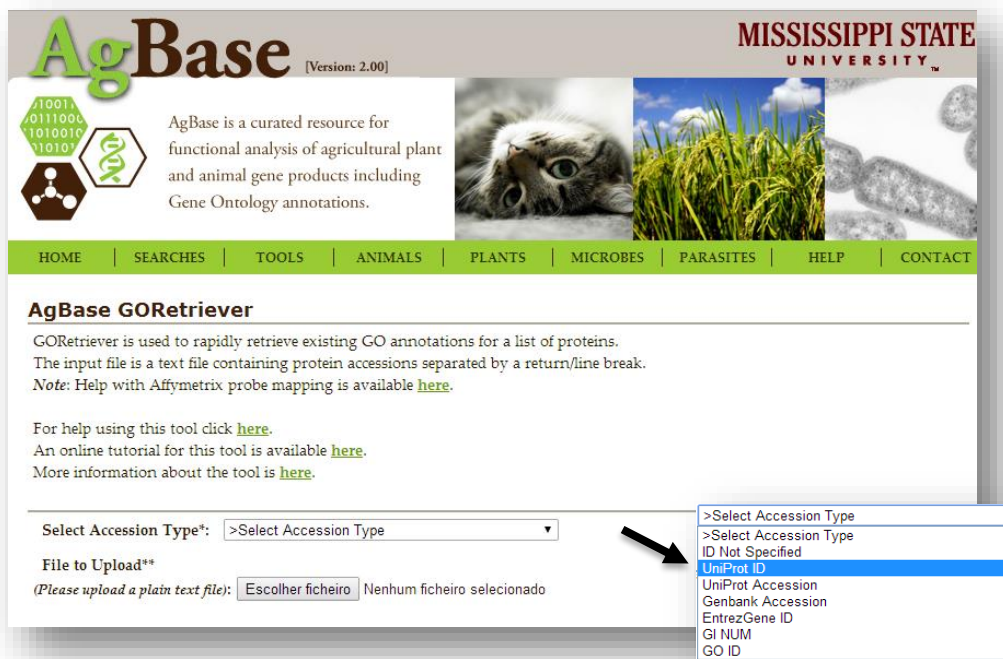


Figura 21: Página inicial da ferramenta GORetriever da plataforma bioinformática Agbase (<http://www.agbase.msstate.edu/>). Figura adaptada da ferramenta bioinformática GORetriever consultável no portal Web Agbase.

Numa fase posterior, descarregou-se o ficheiro “GO Summary file (para usar no GOSlim Viewer)” e realizou-se o envio desse ficheiro na ferramenta “SlimViewer” do Agbase selecionando a opção “Generic”. O ficheiro apresentava os códigos UniProt das proteínas, ID da ontologia bem como a sua classificação associada a: “P” (processo biológico), “C” (componente celular) e “M” (função molecular) (Figura 22).

O “SlimViewer” é usado para fornecer um resumo das funções para um conjunto de dados usando um conjunto de “GO slims”, o que facilita a interpretação dos resultados. Os “GO Slims” são listas de GO, que foram selecionados a partir de todo o conjunto de termos disponíveis no projeto Gene Ontology (GO).

AgBase [Version: 2.00]

MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY

AgBase is a curated resource for functional analysis of agricultural plant and animal gene products including Gene Ontology annotations.

HOME | SEARCHES | TOOLS | ANIMALS | PLANTS | MIB

GORetriever Results

Number of Input IDs: 11

Input filename: COD_SALIVA.txt

Evidence Codes to return: IC,IDA,IEA,IEP,IGI,IMP,IPL,ISS,NAS,ND,RCA,TAS,N

[View GO annotation file in tab-delimited format\(can be opened in Excel\)](#)

[View ID List without GO annotation](#)

[GO Summary file \(for use in GOSlimViewer\)](#) →

A	B	C
Accessions	GO: IDs	Ontological classification
D7PBH4	GO:00052:F	
D7PBH4	GO:00055:F	
D7PBH4	GO:00068:P	
E2QXE7	GO:00055:C	
E2QXE7	GO:00082:F	
E2QXJ0	GO:00082:F	
H2B3G5	GO:00052:F	
H2B3G5	GO:00055:F	
H2B3G5	GO:00055:C	
H2B3G5	GO:00068:P	
H2B3G5	GO:00360:F	
J9P127	GO:00037:F	
J9P127	GO:00057:C	
J9P127	GO:00070:P	
J9P127	GO:00300:P	
J9P127	GO:00429:P	
O18873	GO:00055:C	
O18873	GO:00068:P	

Figura 22: Descarregar o ficheiro “GO Summary file (for use in GOSlimViewer)” para posterior utilização na ferramenta “GOSlim Viewer”. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GO Retriever consultável no portal Web Agbase.

Num segundo momento com o ficheiro obtido fazemos uso da segunda ferramenta GO Slim Viewer para adquirirmos as anotações das ontologias. Os resultados podem ser obtidos de dois modos: número de proteínas envolvidas em cada processo biológico, componente celular ou função celular “view biological process”, ou então num formato discriminado em que cada proteína tem relacionado a sua ontologia “view accession for each slim id”. Estes resultados estão exemplificados nas figuras 23 e 24.

O procedimento descrito permite ter conhecimento das proteínas presentes em OvisOme que possuem descrição ao nível das ontologias.

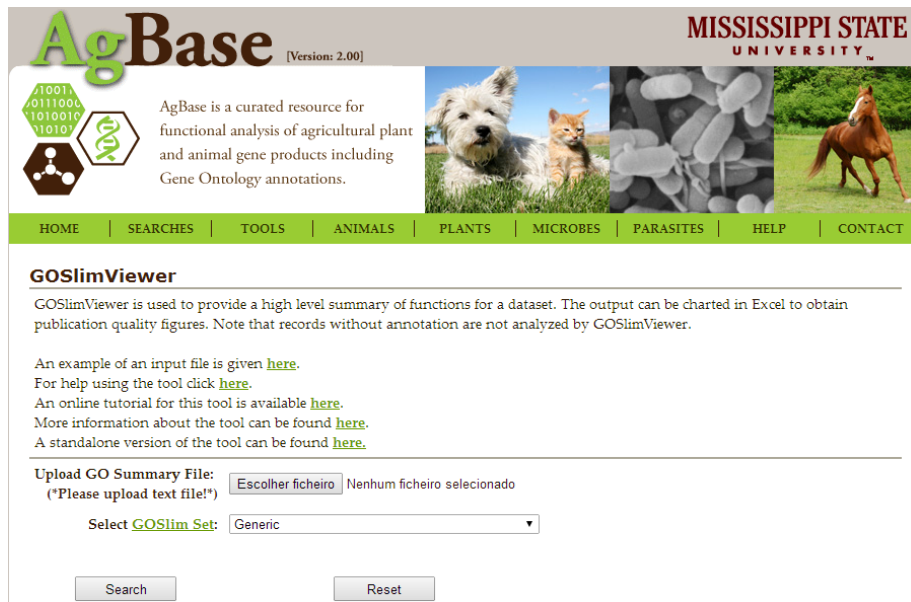


Figura 23: Página inicial da ferramenta informática GoSlimViewer obtida através da plataforma Agbase <http://www.agbase.msstate.edu/>. Seleção da opção “Generic” na seção “select GoSlim Set”. Fazer o *upload* do ficheiro descarregado na opção “Go Summary file (for use in GOSlim Viewer)” na ferramenta GoRetriever. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web Agbase.

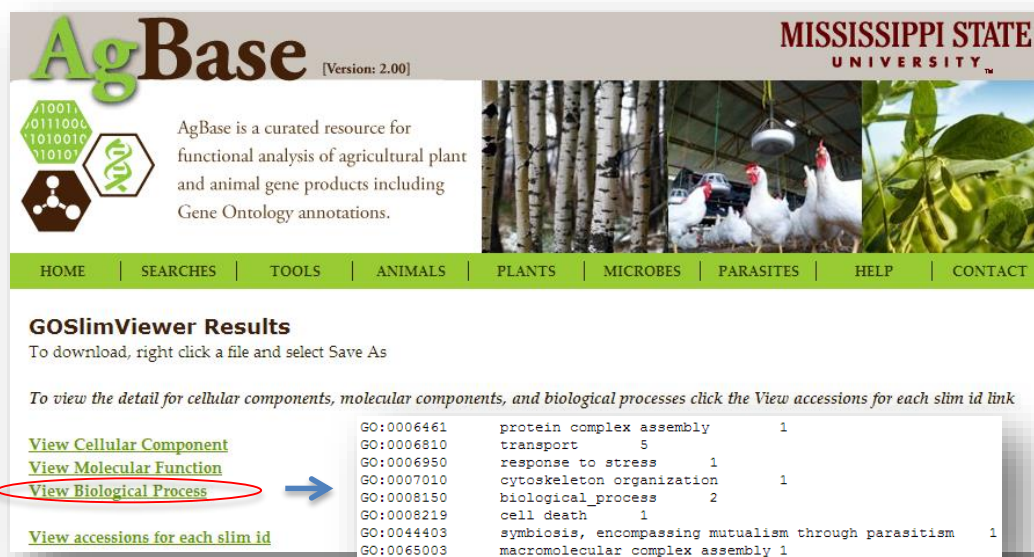


Figura 24: Selecionar a opção “View Biological Process”, a seguir obtém-se os processos biológicos em que estão envolvidas as proteínas. Ao lado do nome do processo está indicado o número de proteínas envolvidas em cada um destes. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web Agbase.

Os resultados obtidos pela figura 25 são usados para fazer os gráficos referentes ao nº de proteínas envolvidas em cada processo biológico.

AgBase [Version: 2.00]

MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY

AgBase is a curated resource for functional analysis of agricultural plant and animal gene products including Gene Ontology annotations.

HOME | SEARCHES | TOOLS | ANIMALS | PLANTS | MICROBES | PARASITES | HELP | CONTACT

GOSlimViewer Results
To download, right click a file and select Save As

To view the detail for cellular components, molecular components, and biological processes click the View accessions for each slim id link

[View Cellular Component](#)
[View Molecular Function](#)
[View Biological Process](#)

[View accessions for each slim id](#)

GOSlimViewer accession detail for each slim id

[View accessions for each slim id text only](#)

Index	A	B	C	D	E	F
	GO_Type	Slim_GO_ID	Slim_GO_Name	Input_Accession	Input_GOID	Input_GO_Name
1	C	GO:0005576	extracellular region	E2QXE7	GO:0005576	extracellular region
2	C	GO:0005576	extracellular region	H2B3G5	GO:0005576	extracellular region
3	C	GO:0005576	extracellular region	O18873	GO:0005576	extracellular region
4	C	GO:0005576	extracellular region	O18874	GO:0005576	extracellular region
5	C	GO:0005576	extracellular region	P49822	GO:0005576	extracellular region
6	C	GO:0005576	extracellular region	P49822	GO:0005576	extracellular region
7	C	GO:0005615	extracellular space	Q9TR98	GO:0005615	extracellular space
8	C	GO:0005615	extracellular space	J9P127	GO:0005737	cytoplasm
9	C	GO:0005737	cytoplasm	P49822	GO:0043234	protein complex
10	C	GO:0043234	protein complex	P49822	GO:0015643	toxic substance binding
11	F	GO:0003674	molecular_function	H2B3G5	GO:0005550	pheromone binding
12	F	GO:0003674	molecular_function	O18874	GO:0005550	pheromone binding
13	F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0019825	oxygen binding
14	F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0008144	drug binding
15	F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0030170	pyridoxal phosphate binding
16	F	GO:0003674	molecular_function	D7P8H4	GO:0005549	odorant binding
17	F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0005504	fatty acid binding
18	F	GO:0003674	molecular_function	H2B3G5	GO:0036094	small molecule binding
19	F	GO:0003674	molecular_function	D7P8H4	GO:0005215	transporter activity
20	F	GO:0003674	molecular_function	H2B3G5	GO:0005215	transporter activity
21	F	GO:0003674	molecular_function	O18874	GO:0005215	transporter activity
22	F	GO:0003674	molecular_function			

Figura 25: Selecionar a opção “View accessions for each slim id” na página dos resultados da ferramenta bioinformática GOSlimViewer, a seguir, o ficheiro obtido do GoSlimViewer “View accessions for each slim id text only” foi descarregado e aberto numa folha do Microsoft Excel® 20013. Figuras adaptadas da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web Agbase e do Microsoft Excel® 2013. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web AgBase.

Após recolha dos resultados tomando como exemplo o constante na figura 25 do AgBase relativamente aos processos biológicos importantes para a caracterização das proteínas, construímos uma Tabela Dinâmica. A figura 26 apresenta passo a passo a construção da Tabela Dinâmica até à obtenção de uma tabela que caracteriza funcionalmente cada proteína (tabela funcional). O primeiro passo é a importação dos resultados do AgBase em formato ‘.txt’ para um livro Excel. De seguida é necessário filtrar o tipo de ontologias para processos biológicos. É importante referir que esta tabela apresenta entradas repetidas da mesma proteína, isto deve-se ao fato de algumas proteínas estarem associadas a ambas as ontologias. O objetivo da construção da tabela dinâmica foi o de organizar a tabela anterior de modo a que todas as proteínas pertencentes a uma mesma ontologia e intervenientes numa mesma função biológica específica ficassem corretamente organizadas por grupos de ontologias na coluna “Input_GO_Name”, juntando-se portanto todas as ontologias no mesmo grupo. É necessário criar uma tabela dinâmica com a função ‘plot table’ no Excel.

A tabela dinâmica criada no ponto anterior é convertida em outro formato pela fórmula:

IF(OFFSET(reference;rows;cols;[height];[width]))

A partir desta nova versão da tabela dinâmica, numa nova folha de Excel usamos a fórmula:

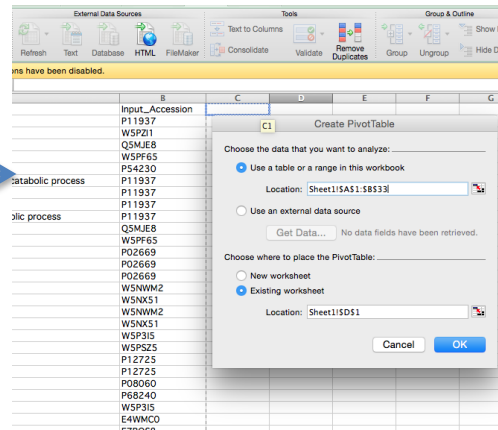
IF(ISERROR(HLOOKUP(A\$1;Tab_Dinam)

para construir a tabela funcional. Esta tabela é preenchida com a informação das ontologias recolhidas do AgBase.

1)

Slim_GO_Name	Input_Accession
1 Slim_GO_Name	Input_Accession
2 cell death	P11937
3 cell death	W5PZ11
4 homeostatic process	Q5MJE8
5 homeostatic process	W5PF65
6 response to stress	P54230
7 nucleobase-containing compound catabolic process	P11937
8 DNA metabolic process	P11937
9 catabolic process	P11937
10 cellular nitrogen compound metabolic process	P11937
11 transport	Q5MJE8
12 transport	W5PF65
13 reproduction	P02669
14 transport	P02669
15 anatomical structure development	P02669
16 transport	W5NWM2
17 transport	W5NWX1
18 biological_process	W5NWM2
19 biological_process	W5NWX1
20 biological_process	W5P315
21 biological_process	W5PSZ5
22 protein maturation	P12725
23 protein maturation	P12725
24 small molecule metabolic process	P08060
25 transport	P68240
26 biological_process	W5P315
27 transport	E4WMC0
28 transport	E7BQS8
29 transport	G3LUQ4
30 transport	P12303
31 transport	P14639
32 transport	P67976
33 transport	W5PTG9

2)



3)

Input_GO_Name	Input_Accession
▼ apoptotic process	P11937
▼ cell death	W5PZ11
▼ cellular iron ion homeostasis	Q5MJE8
▼ cellular iron ion homeostasis	W5PF65
▼ defense response	P50415
▼ defense response	P54230
▼ defense response to bacterium	P50415
▼ defense response to bacterium	P54230
▼ DNA catabolic process	P11937
▼ DNA catabolic process, endonucleolytic	P11937
▼ iron ion transport	Q5MJE8
▼ iron ion transport	W5PF65
▼ lactation	P02669
▼ lipid transport	W5NWM2
▼ lipid transport	W5NWX1
▼ lipoprotein metabolic process	W5NWM2
▼ lipoprotein metabolic process	W5NWX1
▼ metabolic process	W5P315
▼ negative regulation of catalytic activity	W5PSZ5
▼ negative regulation of endopeptidase activity	P12725
▼ negative regulation of peptidase activity	P12725
▼ nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	P11937
▼ one-carbon metabolic process	P08060
▼ oxygen transport	P68240
▼ proteolysis	W5P315
▼ transport	E4WMC0
▼ transport	E7BQS8
▼ transport	G3LUQ4
▼ transport	P12303
▼ transport	P14639
▼ transport	P67976

4)

GO	Input_Accession	Slim_GO_Name
apoptotic process	P11937	
cell death	W5PZ11	
cellular iron ion homeostasis	Q5MJE8	W5PF65
defense response	P50415	P54230
defense response to bacterium	P50415	P54230
DNA catabolic process	P11937	
DNA catabolic process, endonucleolytic	P11937	
iron ion transport	Q5MJE8	W5PF65
lactation	P02669	
lipid transport	W5NWM2	W5NWX1
lipoprotein metabolic process	W5NWM2	W5NWX1
metabolic process	W5P315	
negative regulation of catalytic activity	W5PSZ5	
negative regulation of endopeptidase activity	P12725	
negative regulation of peptidase activity	P12725	
nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	P11937	
one-carbon metabolic process	P08060	
oxygen transport	P68240	
proteolysis	W5P315	
transport	E4WMC0	E7BQS8 G3LUQ4
vitamin transport	W5PTG9	

5)

GoSlimOntology	UniprotKBAC	Slim_GO_Name
Name		
Ontology		
biological process	lipoprotein metabolic process	
catabolic process	metabolic process	
cell death	proteolysis	
cellular nitrogen compound metabolic process	DNA catabolic process	
DNA metabolic process	apoptotic process	
homeostatic process	cell death	
	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	
	DNA catabolic process, endonucleolytic	
	cellular iron ion homeostasis	

Figura 26: Tabela dinâmica – Proteínas salivares de ovino com os processos biológicos correspondentes. 1) Importação dos resultados do AgBase exemplificados na figura 23; 2) Criação de tabelas dinâmicas com a função 'plot table' no Excel; 3) Tabela dinâmica criada; 4) Criação de uma segunda tabela dinâmica; 5) conversão dos dados numa tabela funciona.

3.2 COLHEITA, ARMAZENAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE SALIVA EM OVELHAS SERRA DA ESTRELA

Durante a concretização da criação da base de dados e do estabelecimento das redes de interação, concebemos metodologias de recolha e armazenamento de amostras de saliva de ovelha Serra da Estrela exploradas nesta secção.

Na Região de Viseu existe uma espécie autóctone de ovinos denominada Serra da Estrela. De acordo com censos 2013 existem 16789 ovinos dispersos por 625 explorações, sendo os animais destinados predominantemente para a produção de leite destinado à manufactura de queijos típicos desta região.

O trabalho levado a cabo neste capítulo teve como objectivos a criação de uma Coleção de Amostras de Saliva de ovelhas Serra da Estrela, criação e estabelecimento de protocolos de colheita, armazenamento e controlo de qualidade das amostras, bem como estabelecimento do procedimento para a catalogação das amostras no Coleção de Amostras.

3.2.1 ESTABELECIMENTO DA METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SALIVA

A primeira etapa da fase experimental deste trabalho foi a criação e verificação da exequibilidade de dois protocolos: um da colheita das amostras da saliva de ovelhas e um para o processamento das amostras e divisão em alíquotas para serem armazenadas na Coleção de Amostras de Saliva.

O protocolo de recolha de saliva suscitou desde o primeiro momento da sua proposta algumas preocupações: que materiais usar para colher a saliva da cavidade oral da ovelha e como a acondicionar para ser transportada até ao laboratório. Os cotton-roll ou rolhões surgiram como solução para absorver a saliva. Este matéria é absorvente e resistente para sofrer centrifugações. Haviam sido pensadas outras soluções como zaragatoas, mas devido ao seu preço e quantidade de amostras que iria ser recolhida foi descartada. Para acondicionar e transportar os rolhões embebidos em saliva utilizámos tubos de 50ml. O processo de montagem deste material está demonstrado na figura 27.

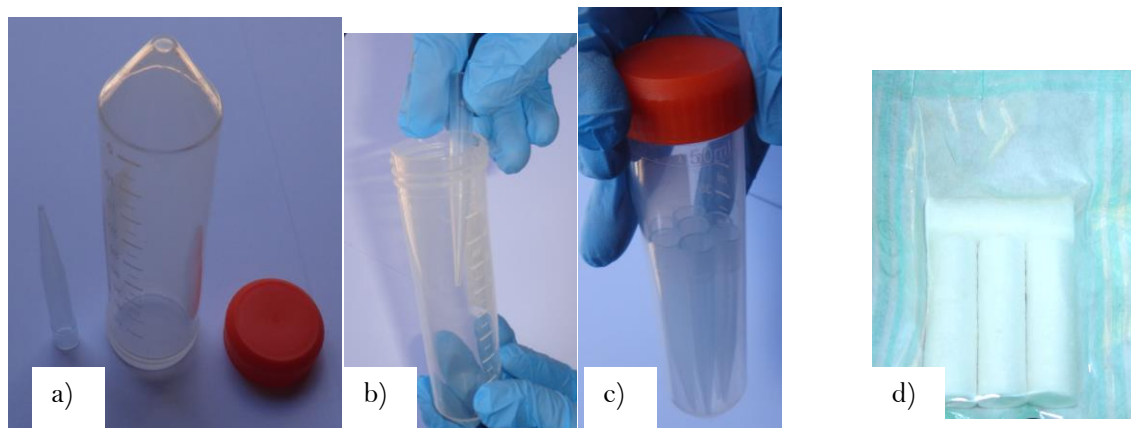


Figura 27: Montagem do material da colheita de saliva: a) tubos 50ml b-c) pontas de micropipeta p1000. A montagem é feita com a inserção de 7 pontas nos tubos de 50ml e depois segue para esterilização. d) Após autoclavagem os rolhões são entregues em pacotes à parte para serem colocados na cavidade oral da ovelha e posteriormente no tubo esterilizado.

Posteriormente passou-se à fase de testes com um rebanho com cerca de 30 ovelhas no dia 2 de Dezembro de 2013 na Escola Agrária de Viseu. Para a recolha utilizou-se também de bata, luvas e uma pinça hemostática (fôrceps) que permita segurar o rolhão de forma a conseguirmos fazê-lo passar na zona do vestíbulo oral entre a arcada alvéolo-dentária inferior, durante aproximadamente 20 a 30 segundos (figura 28). Usou-se 2 rolhões por ovelha. Os rolhões com a saliva são colocados no interior dos tubos de 50ml sobre as pontas p1000.



Figura 28: Recolha de saliva em ovinos da Escola Agrária de Viseu. Os rolhões são seguros por uma pinça hemostática que os faz passar na cavidade oral durante 20-30 segundos. Posteriormente os rolhões são inseridos nos tubos de 50ml sobre as pontas p1000.

Uma vez que as recolhas iriam ser concretizadas grande parte das vezes no campo, era necessário manter as amostras refrigeradas e organizadas sem dificuldade e nesse sentido foi construída uma mala que acompanharia o veterinário e a sua assistente durante as colheitas (figura 29). Para a correta conservação das amostras estas foram transportadas na caixa térmica com gelo e/ou sacos térmicos onde podem permanecer cerca de 48h colocando

a caixa térmica numa arca ou congelador. Findo este período as amostras são conservadas numa arca a -80°C .

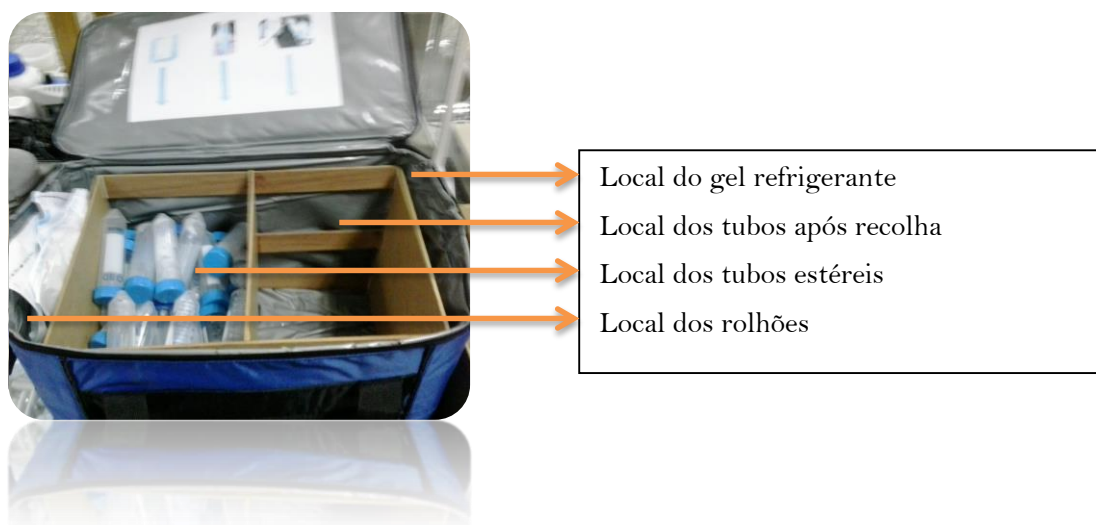


Figura 29: Mala térmica criada para acompanhar o veterinário e a sua assistente durante as colheitas com todo o material necessário (gel refrigerante, tubos vazios e rolhões).

Por ordem cronológica a metodologia da recolha das amostras consiste na catalogação dos tubos de 50ml com o código do rebanho, a data da colheita e o número da amostra (1-10), seguindo-se a recolha da saliva com os rolhões e acondicionamento nos tubos previamente etiquetados e armazenamento das amostras na mala térmica. A catalogação dos tubos permite que as amostras sejam associadas à base de dados da Coleção de Amostras de Saliva. Para pormos em prática esta metodologia de catalogação das amostras, foi criado um código que identificasse de forma inequívoca cada amostra. Para isso usámos o código de exploração, como por exemplo HX55A, que pertence apenas à localização em que está o rebanho não sendo repetida para outras explorações, a data de recolha da amostra, e por fim o número da amostra. O número da amostra corresponde ao código identificador da ovelha.

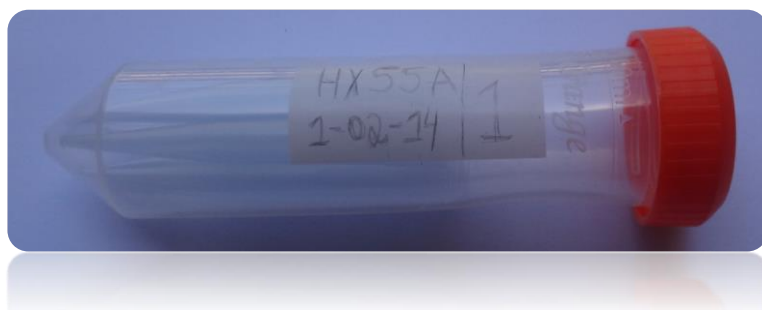


Figura 30: A catalogação dos tubos de colheita de saliva.

Outro protocolo que foi criado diz respeito ao processo de armazenamento das amostras a -80°C (para que a atividade proteolítica possa seja mínima ou nula). Assim por forma a evitar congelamentos e descongelamentos das amostras para os diversos passos de análise as amostras de saliva foram fraccionadas em alíquotas cujo número e volume fica também registado na base de dados da Coleção de Amostras de Saliva. O método de armazenamento consistiu assim na admissão dos tubos com as amostras de saliva, preenchimento da base de dados da Coleção com a informação do individuo importadas da tabela de recolha, atribuição do código único de armazenamento da amostra de forma sequencial (Ia/1, Ia/2,...), centrifugação e divisão em alíquotas de $250\mu\text{l}$ de saliva e armazenamento a uma temperatura -80°C . Este armazenamento obedece ao preenchimento obrigatório da Base de dados da Coleção onde são adicionados os dados relativos à amostra antes de ser armazenada.

As amostras recebidas são centrifugadas a 20000 rcf durante 10 minutos a 4°C , e depois divididas nas alíquotas estabelecidas, tendo os tubos criogénicos sido previamente identificados com os códigos estabelecidos. A identificação das alíquotas é feita com marcador de cor e com código de armazenamento. A cor é dividida por raça. Uma vez que a raça para este estudo é Serra da Estrela foi atribuída a cor verde. O código de armazenamento tem as letras Ia, sendo I uma letra romana que identifica para o organismo *Ovis aries* e a corresponde à raça Serra da Estrela, seguido de um número sempre consecutivo que teve início na amostra 1.

3.2.2 ESTABELECIMENTO DO PROCESSO DE REGISTOS DE AMOSTRAS DE SALIVA

Uma vez que as recolhas de saliva decorreram durante três meses do presente ano lectivo, e como o número de amostras e rebanhos seria grande, surgiu a necessidade de criar códigos das amostras e tabelas que fossem aplicados tanto por quem executa o trabalho no campo, como por quem recebesse as amostras para depois proceder ao seu armazenamento, garantindo a correta utilização do sistema de códigos. Desse modo procedemos à criação de duas tabelas (uma tabela de recolha e uma tabela de armazenamento), que convergiam para uma base de dados de identificação das amostras. Os cabeçalhos partilhados por ambas as tabelas diziam respeito ao código da amostra, código de armazenamento, o código da localização, o código do organismo e as datas de recolha da saliva. Em particular a tabela da recolha teria que ter alguns campos adicionais: o género, a idade (em meses), o tipo de alimentação (pasto, ração ou feno), qual o estado de saúde do animal, se estavam presentes lesões orais, ou outras doenças e por fim que patologias recentes o animal teve. No caso da

tabela de armazenamento tinha campos adicionais: a data de armazenamento o número de réplicas bem como as observações que podem ser feitas à amostra, nomeadamente presença de cor (verde dos pastos, ou vermelha por contaminação com sangue).

Os dados das amostras recolhidas foram registados numa tabela de recolha com os campos: número da amostra, código do rebanho, freguesia onde está localizado o rebanho, o código identificador da ovelha, o género, idade e tipo de alimentação (pasto, feno ou palha), o estado de saúde, a data de recolha e possíveis observações (tabela 2).

Tabela 2: Dados de registo na tabela da recolha das amostras de saliva

Sample Number
Flock Code
Freguesia
Sheep ID
Gender
Age
Pasture (X)
Feed (X)
Hay (X)
Health
Oral Lesions *
Other diseases *
Recent pathologies (Last 3 months)
Collection Date
Storage Date
Number of Replicates (250µ l)
Observations

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A criação da base de dados, o OvisOme dedicado à catalogação dos proteomas parciais de ovelha, surgiu como uma necessidade decorrente da inexistência de uma base de dados que integre toda a informação relativa ao assunto a qual se encontra dispersa pela bibliografia e por outras bases de dados como o UniProt ou a AgBase. As bases UniProt e AgBase contêm depositadas muitas proteínas identificadas em Ovis (23.110), mas são poucas as proteínas cuja informação foi revista manualmente (455). A maioria das proteínas anotadas diz respeito a informação obtida a partir de estratégias bioinformáticas, ou seja são proteínas que hipoteticamente poderão vir a ser identificadas em amostras biológicas de Ovis. Também estas bases de dados não contêm informação relativa às técnicas utilizadas para a identificação e caracterização das proteínas.

A base de dados OvisOme teve como objectivo integrar as proteínas revistas anotadas na base de dados UniProt, e as proteínas descritas como tendo sido identificadas em amostras biológicas diversas obtidas a partir de indivíduos com patologias diversas e também em estado de saúde, ou seja a informação revista e anotada diz respeito a proteínas que já foram identificadas, realmente. A criação de uma base com esta natureza permitirá estudos futuros para a identificação de proteínas que se apresentam alteradas em situações patológicas, no sentido de poderem ser esclarecidos os mecanismos de patogénese. Também a identificação de proteínas que aparecem alteradas em situações diversas poderão ser propostas como possíveis biomarcadores destinados a estudos de validação posterior, visando a criação de painéis de proteínas destinadas ao estabelecimento de diagnóstico em saliva para ovinos.

ANÁLISE IN SILICO

4.1 REVISÃO E ANOTAÇÃO DA INFORMAÇÃO SOBRE OS PROTEOMAS PARCIAIS DE *OVIS ARIES*

De acordo com a metodologia descrita na secção de Material e Métodos, o primeiro passo para a catalogação das proteínas identificadas em estudos de proteómica ou estudos dirigidos, compreendeu a recolha e seleção dos artigos científicos publicados sobre o assunto recorrendo-se à plataforma PubMed. Além da compilação manual das proteínas de *Ovis aries* recolheu-se também o conjunto de proteínas revistas na base UniProt deste organismo (455), adicionando ao OvisOme o conjunto de proteínas para as quais já é conhecido o seu envolvimento em patologia.

A pesquisa avançada com as palavras-chave “sheep AND proteom*” gerou 118 resultados (fig 31) dos quais apenas 39 são estudos de proteómica em ovelhas. Os 79 artigos restantes foram descartados por corresponderem a estudos de optimização de técnicas moleculares (MeiHwa Tanielle Bench Alvarez et al 2013), ou por os organismos estudados não serem *Ovis aries* (Alasdair J. Nisbet et al 2008), ou o estudo ser dirigido a uma proteína em particular não ser identificada em ovelha (Patrícia de Sousa-Pereira et al 2012), ou alguns dos artigos não corresponderem aos termos usados na pesquisa PubMed (Mangesh Bhide et al 2012).



PubMed (sheep[Title/Abstract]) AND proteom*[Title/Abstract]

RSS Save search Advanced

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Recently Added Send to:

Results: 1 to 20 of 118 << First < Prev Page 1 of 6 Next > Last >>

[Species Identification of Archaeological Skin Objects from Danish Bogs: Comparison between Mass Spectrometry-Based Peptide Sequencing and Microscopy-Based Methods.](#)

1. Brandt LØ, Schmidt AL, Mannering U, Sarret M, Kelstrup CD, Olsen JV, Cappellini E. PLoS One. 2014 Sep 26;9(9):e106875. doi: 10.1371/journal.pone.0106875. eCollection 2014. PMID: 25260035 [PubMed - in process] **Free Article** [Related citations](#)

Figura 31: Resultado da pesquisa avançada PubMed – 118 artigos resultantes da pesquisa com as palavras-chave “sheep AND proteom*”

Atualmente estão incluídos 18 artigos no OvisOme. Estes correspondem a estudos publicados entre 2004 e 2013. Estão compiladas 876 proteínas, identificadas em amostras biológicas de ovelha sendo que 512 foram identificadas em 3 artigos científicos publicados

em 2013. Na tabela 1 podemos observar o número de artigos e proteínas de acordo com o ano de publicação.

Tabela 3: Descrição das publicações compiladas na base de dados OvisOme.

Ano do artigo	Nº de artigos	Nº de proteínas
2004	1	12
2006	2	45
2008	3	30
2009	1	27
2010	1	1
2011	4	172
2012	3	69
2013	3	512

Na tabela 4 estão apresentados os artigos científicos de acordo com o ano de publicação, o número de proteínas resultantes do processo de anotação manual e o número de proteínas exclusivas em saúde, doença e comuns entre ambas as situações. Estes números foram obtidos pela comparação dos proteomas obtidos por cada artigo, com o proteoma global depositado na base de dados após ter sido concluído todo o trabalho de importação manual e automática.

Tabela 4: Artigos considerados para constituir a informação da base de dados OvisOme.

Ano Publicação	Referência PubMedID	Proteínas resultantes da revisão e anotação manual	Número de Proteínas Identificadas por cada artigo		
			Saúde	Doença	Comuns em Saúde e Doença
2004	14997497	12	6		6
2006	16619304	18	11		7
	17093219	27		23	4
2008	17888928	8		5	3
	18319425	1		1	
	18384101	21		7	14
2009	19615390	27	20		7
2010	21044301	1			1
2011	21481470	2			2
	21690237	166		165	1
	21963943	1			1
	22025569	3	3		
2012	22088561	2		2	
	22480905	36	36		
	22630135	31	16		15
2013	23542335	1			1
	23748023	94	86		8
	23774600	413		406	7

Além das proteínas compiladas na base de dados com anotação manual (876), a anotação automática resultou em 8 proteínas revistas pelo UniProt com envolvimento em doença. Deste modo o OvisOme complementa atualmente 883 proteínas, uma vez que uma das proteínas oriundas da anotação automática já se encontrava na base de dados caracterizada por um dos artigos correspondendo à mesma patologia e estando identificada na urina. Por isso apenas 7 das 8 proteínas foram incluídas no OvisOme. A proteína Major prion é um exemplo de uma proteína anotada no UniProt como envolvida na patologia scrapie mas que no entanto não foi compilada no OvisOme porque já tinha sido identificada através da anotação manual com o PubMed ID 18319425

A base de dados OvisOme apresenta no seu total 883 proteínas, das quais 184 proteínas foram identificadas em animais saudáveis; 623 em animais com patologias diversas sendo que 77 proteínas estão presentes tanto em saúde como em doença (figura 32).

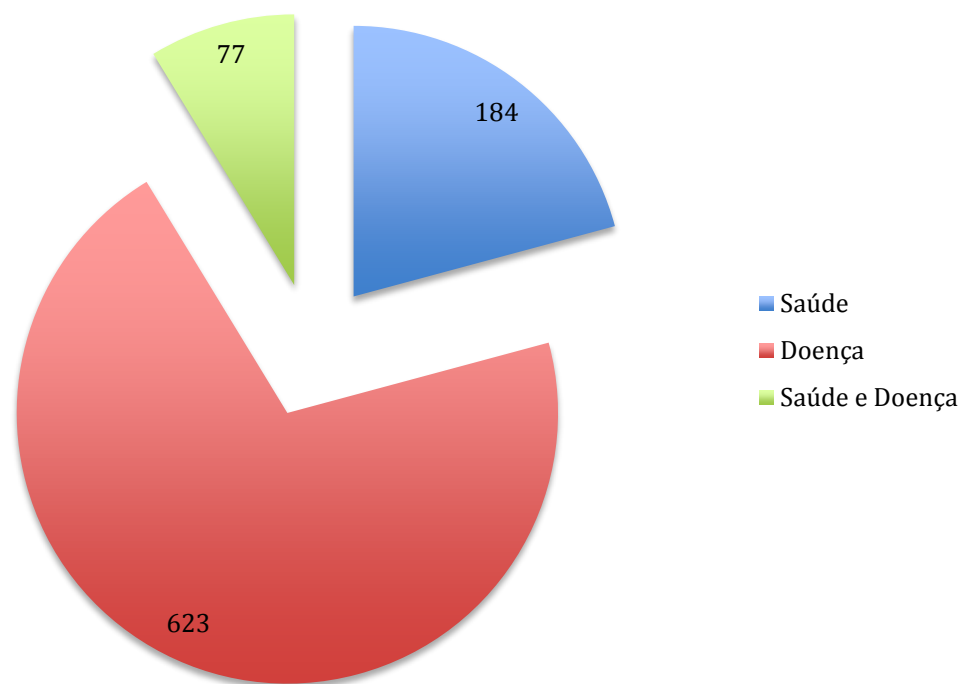


Figura 32: Total de proteínas da base de dados OvisOme identificando o número de proteínas em estado de saúde, patologia e comuns em saúde e patologia.

As proteínas descritas em condição saúde (184) foram identificadas em diversos tipos de amostras biológicas: saliva, fluido cérebroespinal, lã, plasma seminal, soro, linfa e lágrima (figura 33). O fluido biológico plasma seminal representa o maior proteoma parcial contendo 94 proteínas identificadas em saúde no OvisOme, contrariamente à lágrima em que apenas foram identificadas 3 proteínas.

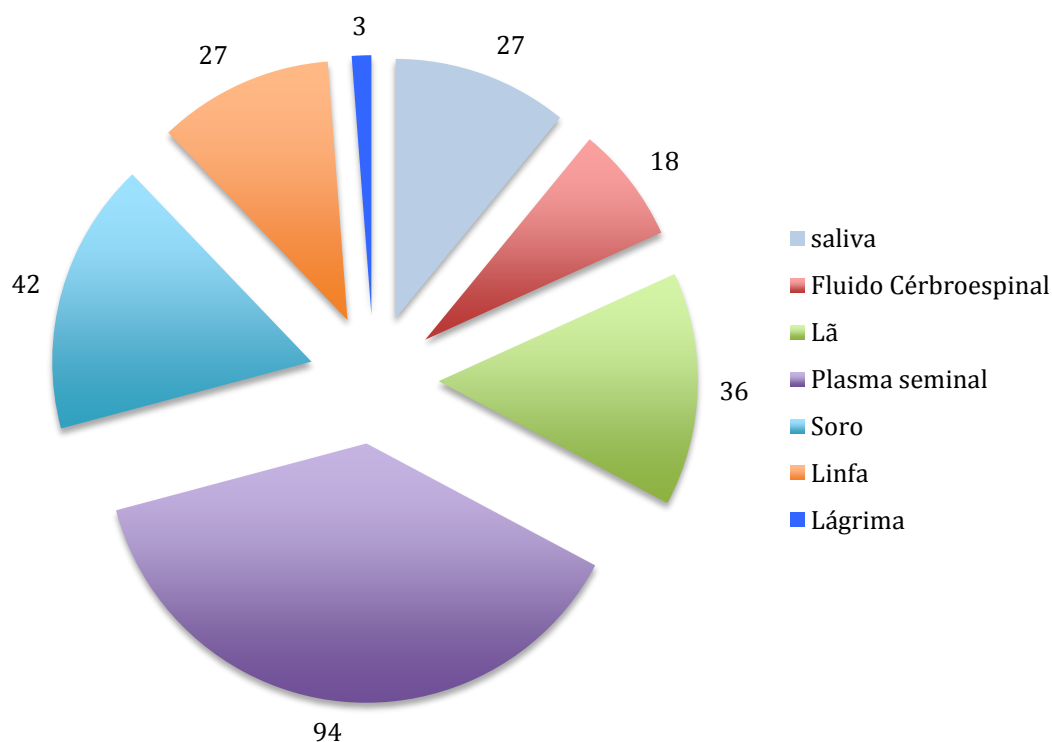


Figura 33: Distribuição das proteínas depositadas na base de dados OvisOme em saúde de acordo com o tipo de amostra biológica em que foram identificadas.

Para além da informação relativa à identificação das proteínas, o OvisOme abrange também a caracterização dos ovinos usados no estudo. Em apenas 11 dos 18 estudos estão descritas as raças de ovelha utilizadas para o estudo, sendo: Sarda, Romanov, Merino, Comisana, Clun Forest, Corriedale, German Blackface, New Zealand Borderdale, e various breeds (figura 34). Não existem estudos incluídos na base de dados OvisOme relativo a ovinos da raça Serra da Estrela, uma vez que ainda não foi publicado qualquer trabalho sobre o assunto.

Existem 215 proteínas repartidas por estudos em que a raça dos animais usados no trabalho não são identificados.

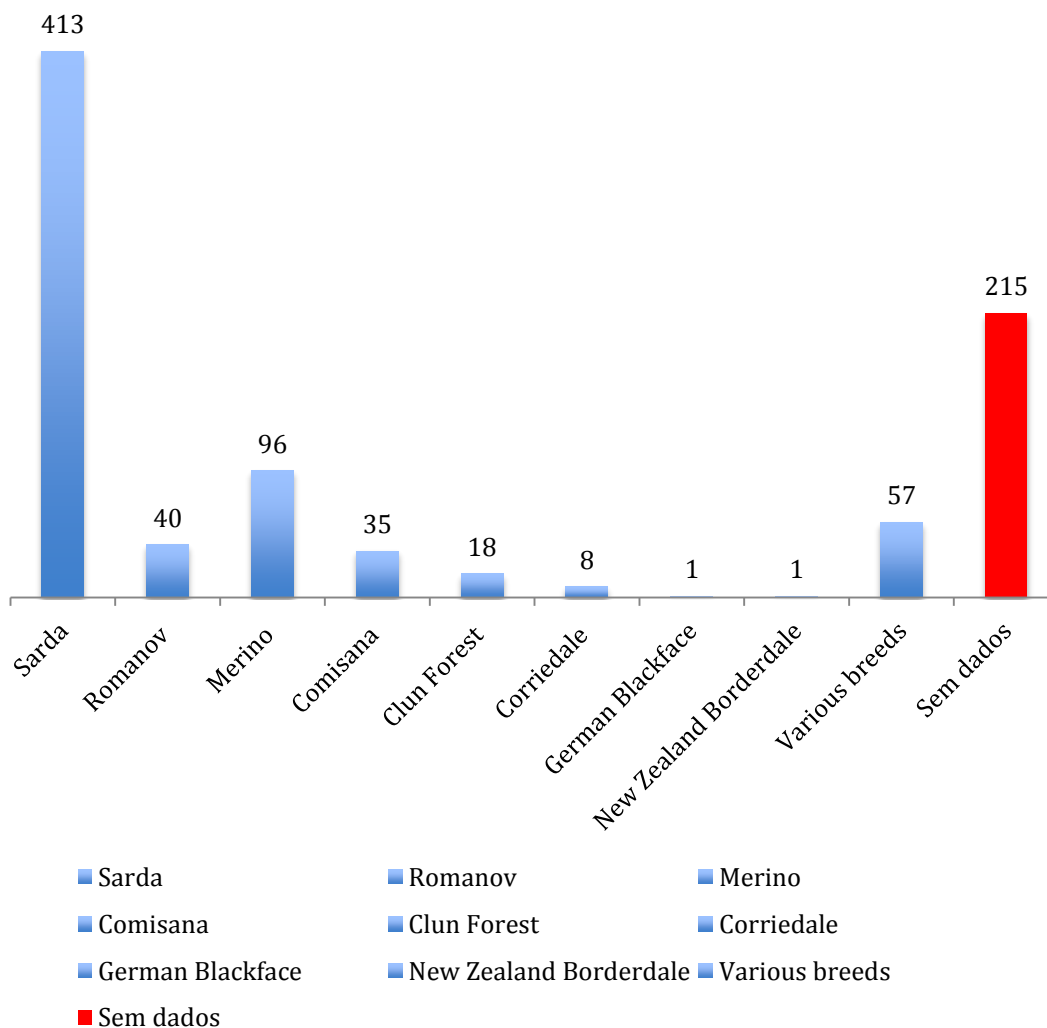


Figura 34: As raças utilizadas para os estudos de proteômica (Sarda, Romanov, Merino, Comisana, Clun Forest, Corriedale, German Blackface, New Zealand Borderdale, e crossbreed), respetivo número de proteínas identificadas, bem como o número de proteínas sem raça atribuída.

Os dados de regulação da expressão ou seja a apresentação de dados quantitativos sobre a quantidade da proteína presente na doença, face à quantidade presente na saúde. A grande maioria dos artigos apenas apresenta dados qualitativos dando indicação se a proteína se encontra aumentada ou diminuída por comparação com o estado de saúde. Estes dados são uma caracterização importante no estudo e identificação das proteínas, pois serão eles que permitirão encontrar quais as proteínas melhores candidatas em propostas de biomarcadores.

O OvisOme também integra a anotação de dados de regulação disponibilizados pelos estudos. Esta informação é descrita em estudos de casos patológicos. No entanto alguns dos estudos são desprovidos desta caracterização. Do total de proteínas anotadas como envolvidas em doença (623), 59 não têm dados de regulação (figura 35).

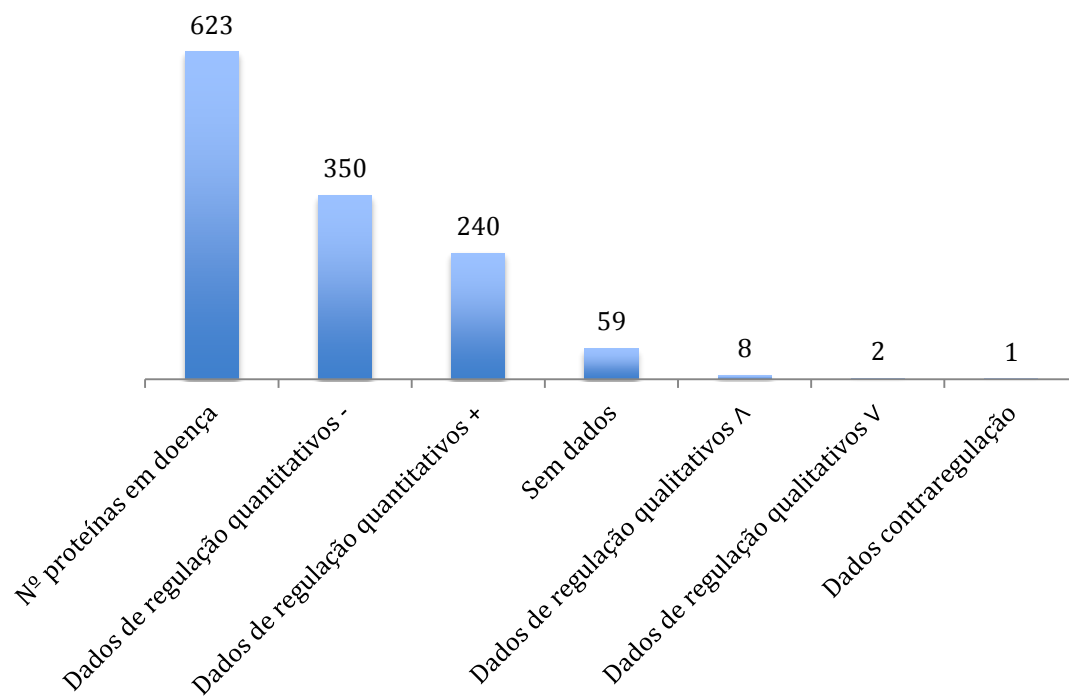


Figura 35: Distribuição dos dados de regulação em proteínas anotadas manualmente na base de dados OvisOme.

4.2 PATOLOGIAS E AS PROTEÍNAS CATALOGADAS NA BASE DE DADOS OVISOME

A organização das proteínas de acordo com as patologias em que foram identificadas permite conhecer melhor a informação depositada no *OvisOme*. Até à presente data, esta base de dados tem 12 patologias anotadas resultantes da anotação manual (8) e da anotação automática (4). As proteínas identificadas em 9 destes estudos correspondem a patologias nomeadamente: muscle hypertrophy (Hamelin *et al* 2006), fasciolosis (Rioux *et al* 2008), infeção por nematode (Goldfinch *et al* 2008), scrapie (Andrievskaia *et al* 2008), Johne disease (Zhong *et al.* 2011), mastitis (Addis *et al.* 2013, Addis *et al.* 2011) kidney injury (Palviainen *et al* 2011), e infeção parasitária sheep scab ou mites (Wells *et al* 2013). As restantes patologias (amyloidosis, batten, câncer e porphyria cutânea tarda) foram compiladas no OvisOme pelo procedimento de anotação automática (figura 36).

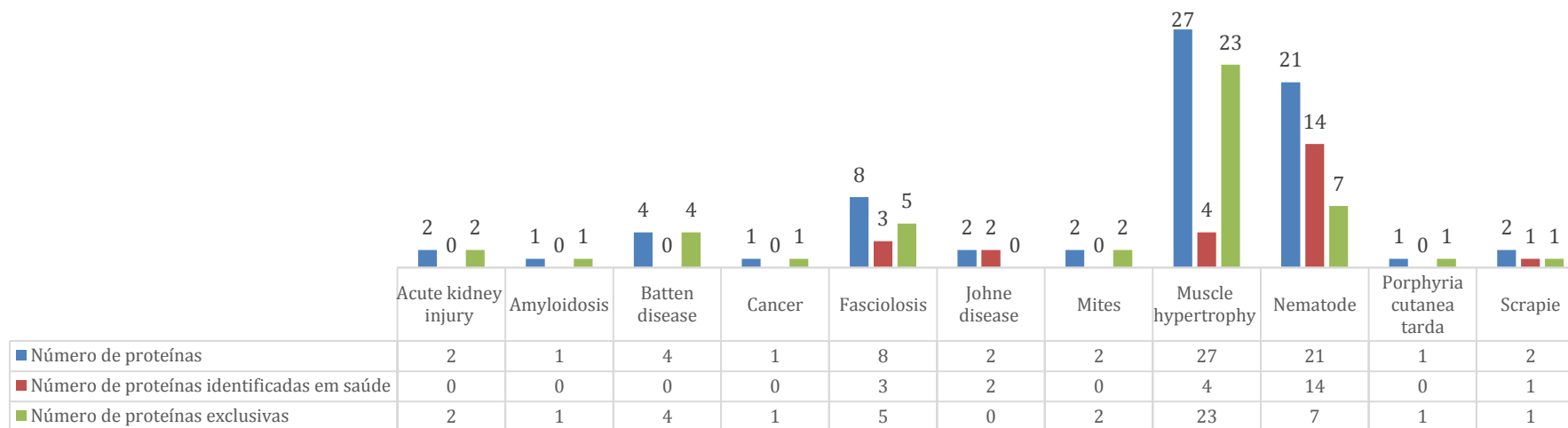


Figura 36: Distribuição das proteínas depositadas na base de dados *OvisOme* de acordo com as patologias em que foram identificadas.

A infecção por *S. uberis* e *Mycoplasma agalactiae*, são a causa de Mastitis. Esta patologia com maior número de proteínas anotadas na base de dados OvisOme tem um total de 586 proteínas identificadas em dois dos estudos com a infecção por cada uma das duas espécies de bactérias. Do total de proteínas 7 estão presentes noutros estudos como envolvidas na condição de saúde e 579 como exclusivas nesta doença (figura 37).

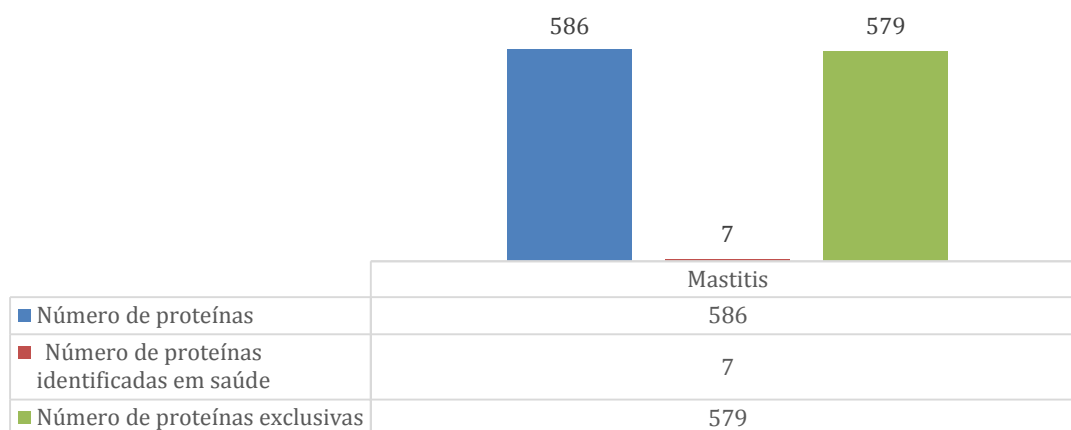


Figura 37: Distribuição das proteínas depositadas na base de dados *OvisOme* de acordo com as patologias em que foram identificadas.

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COMO EXCLUSIVAS DE PATOLOGIAS

Algumas das proteínas identificadas em determinada doença foram também identificadas noutras patologias ou em saúde, o que não as torna exclusivas dessa patologia. A determinação do carácter de exclusividade de cada proteína identificada em cada patologia permitiu concluir que existem 518 proteínas exclusivas distribuídas por 9 patologias. Das 12 patologias com anotação no OvisOme, apenas 9 possuem proteínas exclusivas entre as condições de saúde e doença. A patologia Mastitis possui o maior número de proteínas (482) (tabela 6). A tabela 5 apresenta a distribuição das proteínas exclusivas pelas patologias com a indicação do tipo de amostra onde foram identificadas, a sua regulação, raça do animal e observações.

Tabela 5: Lista das proteínas exclusivas das patologias incluídas no OvisOme.

Patologia	Código UniProt	Nome	Tipo de amostra biológica	Regulação	Raça	Observações
Amyloidosis	P42819	Serum amyloid A protein				Anotação automática UniProt
Batten	P17605	ATP synthase (ATP synthase proteolipid P1)				Anotação automática UniProt
	Q06056	ATP synthase (ATP synthase proteolipid P2)				Anotação automática UniProt
	Q9MZS8	Cathepsin D (Fragment)				Anotação automática UniProt
	A2TJ54	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5			New Zealand Borderdale	Anotação automática UniProt
Cancer	P51664	Cellular tumor antigen p53				Anotação automática UniProt
Fasciolosis	Q99149	Transferrin (Fragment)	Soro	+	Corriedale	
	B6E3I8	Enolase 1 (Fragment)	Soro		Corriedale	
	B3VSC1	Regucalcin	Soro	-	Corriedale	
	Q8MIP8	Glutamate dehydrogenase (Fragment)	Soro	+	Corriedale	
	W5PWM0	Uncharacterized protein	Soro		Corriedale	
Acute kidney injury	W5PKW1	Uncharacterized protein	Urina	+		
	O62848	Antigen-presenting glycoprotein CD1d	Urina	+		
Muscle hypertrophy	O18751	Glycogen phosphorylase	Músculo		Romanov	
	B7TJ13	Phosphoglycerate kinase	Músculo		Romanov	
	W5PVU5	Proteasome subunit beta type	Músculo		Romanov	
	W5P5W9	Triosephosphate isomerase (Fragment)	Músculo		Romanov	
	W5NYJ1	Uncharacterized protein	Músculo		Romanov	
	W5PCW4	Uncharacterized protein	Músculo		Romanov	
	W5Q1L2	Uncharacterized protein	Músculo		Romanov	
	W5QAE8	Uncharacterized protein	Músculo		Romanov	
	W5P663	Uncharacterized protein	Músculo		Romanov	
	W5PFT7	Uncharacterized protein	Músculo		Romanov	
	W5PJ69	Uncharacterized protein	Músculo		Romanov	
	W5NRY1	Uncharacterized protein	Músculo		Romanov	
	W5PJB6	Uncharacterized protein (Fragment)	Músculo		Romanov	
	W5PUH7	Uncharacterized protein (Fragment)	Músculo		Romanov	
	W5Q216	Uncharacterized protein (Fragment)	Músculo		Romanov	
Nematode	W5PQ98	Uncharacterized protein	Linfa		Crossbred	
	W5PPQ8	Uncharacterized protein	Linfa		Crossbred	
	P81286	Plasminogen	Linfa		Crossbred	
	W5QAB1	Uncharacterized protein	Linfa		Crossbred	
	W5PAM5	Uncharacterized protein	Linfa		Crossbred	
	W5PJG0	Serum amyloid A protein	Linfa		Crossbred	
	I1WXR3	Alpha-1-antitrypsin transcript variant 1	Linfa		Crossbred	
Scrapie	P23907	Major prion protein	Urina			

Tabela 6: Proteínas exclusivas da patologia Mastitis (tabela parcial, completa no anexo 7)

Código UniProt	Nome	Tipo de amostra biológica	Regulação	Raça
P62262	14-3-3 protein epsilon (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1)	Tecido mamário	3,81	Sarda
Q6Q311	40S ribosomal protein S25	Tecido mamário	-2,44	Sarda
Q6Q312	40S ribosomal protein S26	Tecido mamário	-2,88	Sarda
W5QG75	40S ribosomal protein S3a	Leite	2,03	
W5PFW3	40S ribosomal protein S4	Tecido mamário	-2,28	Sarda
P00349	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)	Leite	4,62	
W5PQR5	60S ribosomal protein L18	Tecido mamário	-1,65	Sarda
W5P2M4	60S ribosomal protein L27 (Fragment)	Tecido mamário	-1,58	Sarda
W5P3J0	60S ribosomal protein L6	Tecido mamário	-1,53	Sarda
Q28559	Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)	Tecido mamário	-4,70	Sarda
W5NVB9	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	Tecido mamário	-2,93	Sarda
P60713	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	Tecido mamário	5,07	Sarda
W5QAX3	Actin, cytoplasmic 1 (Fragment)	Tecido mamário	2,12	Sarda
W5PZ56	Acyl-CoA desaturase (Fragment)	Leite	1,57	
W5QG17	Adenylyl cyclase-associated protein	Tecido mamário	-2,83	Sarda
W5QG16	Adenylyl cyclase-associated protein	Leite	1,53	
C5IWU0	ADP-ribosylation factor 1 (Uncharacterized protein)	Tecido mamário	-1,67	Sarda
C5IWT0	ADP-ribosylation factor 4 (Uncharacterized protein)	Leite	1,29	
C5IWU1	ADP-ribosylation factor 6 (Uncharacterized protein)	Tecido mamário	2,02	Sarda
W5PGC5	Aldose 1-epimerase (EC 5.1.3.3) (Galactose mutarotase)	Tecido mamário	-4,69	Sarda
W5QD52	Alpha-lactalbumin	Tecido mamário	-2,58	Sarda
P04653	Alpha-S1-casein	Tecido mamário	1,59	Sarda
E4WMC1	Alpha-S2-casein (Fragment)	Tecido mamário	-2,20	Sarda
E7BQS8	Alpha-s2-casein (Fragment)	Tecido mamário	-3,69	Sarda
W5PZM9	Annexin	Tecido mamário	2,95	Sarda
W5QB19	Annexin	Tecido mamário	-1,65	Sarda
W5PJM4	Annexin	Tecido mamário	-2,64	Sarda
W5PSZ5	Annexin	Tecido mamário	-3,55	Sarda
W5PJM5	Annexin (Fragment)	Tecido mamário	1,53	Sarda
K4P221	Annexin (Fragment)	Tecido mamário	-2,10	Sarda
W5QEU6	Annexin (Fragment)	Tecido mamário	-3,62	Sarda
A2SW69	Annexin A2 (Annexin-2)	Tecido mamário	-1,65	Sarda
P30358	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) (Fragment)	Tecido mamário	-2,00	Sarda
W5P3L4	Asparagine synthetase (EC 6.3.5.4)	Tecido mamário	-2,71	Sarda

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA SALIVA

Um dos objetivos deste trabalho foi construir uma base de dados sobre o proteoma do *Ovis aries* tanto em saúde como em doença e caracterizar as respetivas proteínas.

Trabalhos futuros nesta área vão usar a saliva como fluido de diagnóstico, pois é um uma amostra biológica em que a recolha não é dolorosa nem invasiva para o animal. Com isto uma caracterização pormenorizada das proteínas já identificadas na saliva deste organismo é essencial para em futuras pesquisas ter uma noção do que já foi descoberto.

A figura 38 apresenta uma tabela funcional que foi construída para integrar a informação relativa à caracterização dos processos biológicos em que participam as proteínas identificadas em saliva de acordo com a patologia em que foram identificadas. São escassos os trabalhos desenvolvidos com a saliva no organismo *Ovis aries*. Assim, apesar de estarem identificadas 27 proteínas na saliva de ovelha, apenas 22 possuem anotações de processos biológicos. As proteínas Actin, cytoplasmic 1, Kappa casein, Alpha-S2-casein e as proteínas não caracterizadas (W5NV76 e W5P0X0) não possuem anotadas ontologias ao nível dos

processos biológicos em que estão envolvidas. Como tal não estão incluídas na tabela funcional.

Uma vez que a tabela funcional não pode ser apresentada na sua totalidade optámos por apresentar o conceito com as proteínas que estão são comuns (as mesmas proteínas identificadas em doença estão também identificadas em saúde por outro estudo noutra amostra biológica ou o contrário). São seis as proteínas que se encontram identificadas em situação de patologia: Alpha-1-antiproteinase (P12725), Serum albumin (P14639) e Transthyretin (P12303) e 3 proteínas não caracterizadas (W5NX51, W5NWM2 e W5PF65). As patologias em que estas proteínas participam são: fasciolosis, muscle hypertrophy, mastitis, nematode, scrapie e doença de Johnne (figura 38).

Proteins involved in diseases		Fasciolosis; Muscle hypertrophy; Mastitis	Nematode; Mastitis	Nematode	Fasciolosis; Muscle hypertrophy; Mastitis	Nematode; Muscle hypertrophy	Johne Disease; Scrapie
UniprotKBAC		P12725	W5NX51	W5NWM2	W5PF65	P14639	P12303
Name		Alpha-1-antip	Uncharacter	Uncharacte	Uncharacterize	Serum albumi	Transthyretin
GoSlim Ontology	Ontology						
biological process	lipoprotein metabolic process		+	+			
	metabolic process						
	proteolysis						
catabolic process	DNA catabolic process						
cell death	apoptotic process						
	cell death						
cellular nitrogen compound metabolic process	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis						
DNA metabolic process	DNA catabolic process, endonucleolytic						
homeostatic process	cellular iron ion homeostasis				+		
protein maturation	negative regulation of catalytic activity						
	negative regulation of endopeptidase activity	+					
	negative regulation of peptidase activity	+					
response to stress	defense response						
	defense response to bacterium						
small molecule metabolic process	one-carbon metabolic process						
transport	iron ion transport				+		
	lactation						
	lipid transport		+	+			
	oxygen transport						
	transport		+	+		+	+
vitamin transport	vitamin transport						

Figura 38: Tabela funcional com proteínas identificadas na saliva de ovelha e que são comuns com proteínas identificadas em patologias. É apresentada a caracterização das ontologias que descrevem os processos biológicos em que participam as proteínas.

Encontram-se sugeridos atualmente 2 marcadores moleculares no soro para a doença de Johne (MeSH ID 68010283) (tabela 7). Esta patologia representa grandes perdas económicas e sociais em todo o mundo e também na região de Viseu. Este estudo pretende contribuir para um avanço no estudo de diagnóstico desta patologia.

Tabela 7: Proteínas do soro, com diferenças na regulação na doença de Johne e identificadas como possíveis marcadores moleculares da patologia.

Código UniProt	Nome	Tipo de amostra biológica	Regulação
A8VIE7	Alpha-haemoglobin	Soro	+
P12303	Transthyretin	Soro	-

A proteína Transthyretin está identificada no soro com regulação diminuída na doença de Johne. Foi identificada também em saúde na saliva. É o principal transportador de triiodotironina, tiroxina e vitamina A, através da associação com a proteína ligadora de retinol¹⁷. De acordo com a ferramenta OralCard a sua proteína homóloga humana (P02766) está identificada na cavidade oral (saliva, fluido crevicular, mucosa oral, glândulas minor, sublingual e sub-mandibular) em saúde e em caso de doença como gengivite, periodontite entre outras. O estudo que apresentou esta proteína alterada identificou também a Alpha-haemoglobin protein. Já foi identificada como um biomarcador de soro em pacientes com doença hepática crónica e para o diagnóstico e prognóstico de cancro no ovário¹⁷. Ao contrário de Transthyretin esta proteína não foi identificada na saliva de ovelha. Novamente com recurso à ferramenta OralCard a proteína homóloga humana (Q9NZD4) foi identificada no fluido crevicular o que pode indicar de que esta proteína também poderá ser encontrada em saliva.

Podemos concluir-se deste modo que a proteína Transthyretin proposta como marcador molecular no sangue, pode ser pesquisada na saliva. Assim como esta proteína também outras proteínas identificadas em outras patologias podem ser pesquisadas na saliva, como demonstra a tabela funcional.

COMPONENTE EXPERIMENTAL

4.3 COLHEITA, ARMAZENAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE SALIVA EM OVELHAS SERRA DA ESTRELA

4.3.1 ESTABELECIMENTO DA METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SALIVA

Ao longo do trabalho *in silico* foi criada uma coleção de amostras de saliva de ovelha visando estabelecer o diagnóstico de patologias de ovelha nesse fluido biológico. Como tal o objectivo da etapa experimental visou colheita de amostras de saliva de ovelha e armazenamento num repositório biológico modelo. Os resultados da etapa experimental vão ser apresentados abaixo.

As colheitas de saliva ocorreram entre Fevereiro e Abril de 2014. Foram visitadas 58 explorações de ovinocultura durante estes três meses. A figura 39 mostra o número de rebanhos em que ocorreu a recolha de amostras de saliva por mês.

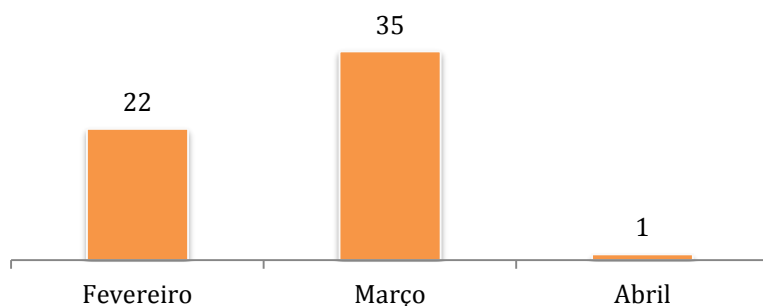


Figura 39: Distribuição do número de colheitas de saliva efetuadas em cada mês

A colheita de saliva ocorreu em 58 rebanhos de explorações divididas por 18 freguesias da região de Viseu (figura 40). De cada rebanho foram recolhidas uma amostra de 10 indivíduos. Ao todo a coleção de amostras de saliva é composto por 580 amostras divididas por diversas alíquotas o que resulta em mais do que 1500 tubos com amostras de saliva devidamente identificadas de acordo com o código único de identificação e com o apêndice (anexo 5) da informação de cada animal incluído.

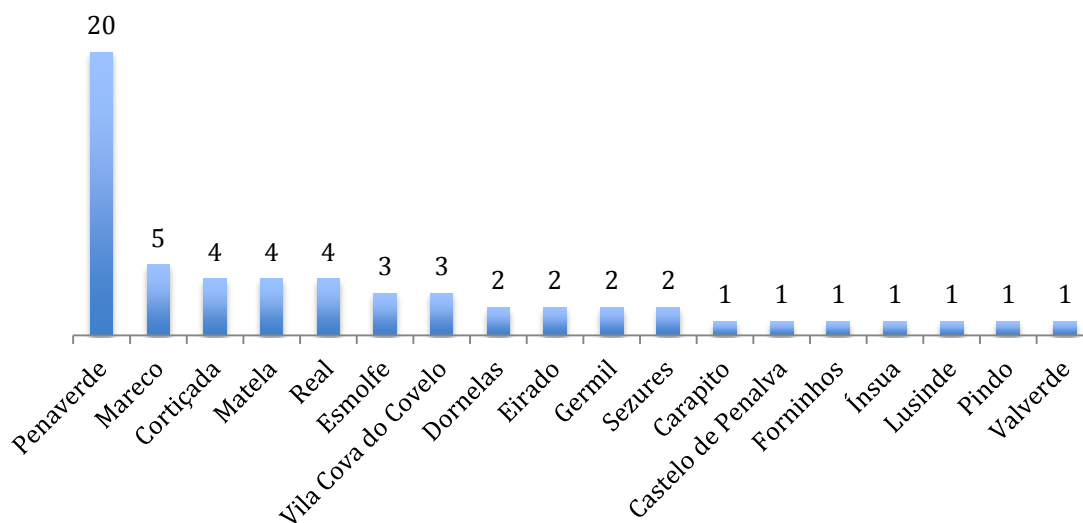


Figura 40: Distribuição do número de colheitas de amostras de saliva efetuadas em cada freguesia da região de Visu.

4.3.2 ESTABELECIMENTO DO PROCESSO DE REGISTOS DE AMOSTRAS DE SALIVA

A saliva foi colhida de animais saudáveis. Em apenas duas ovelhas foram observadas feridas ou abscessos na cavidade oral. Dois dos animais sofreram de problemas digestivos e respiratórios, 4 de problemas digestivos e 79 animais padeceram de problemas respiratórios nos últimos 3 meses.

De modo a estabelecer um controlo de qualidade das amostras a incluir na coleção de amostras de saliva escolhemos a título exemplificativo 9 amostras para ser avaliado o seu perfil de proteínas recorrendo a eletroforese SDS-PAGE. As amostras pertencem a rebanhos diferentes com idades entre os 12 e 126 meses, na sua totalidade fêmeas (tabela 8). As amostras são catalogadas com a numeração de 1 a 9 de acordo com o poço em que se encontra no gel (figura 41).

Tabela 8: Amostras usadas na corrida de SDS-PAGE e respectivas características.

Lane Number	Storage Code	Flock Code	Sheep ID	Gender	Age	Health	Recent pathologies (Last 3 months)
1	Ia/519	HH06D	PT417384009	F	12 M	X	
2	Ia/291	HH14H	PT712987305	F	62 M	X	
3	Ia/164	HX16H	PT417044434	F	22 M	X	
4	Ia/143	HX23H	PT314031930	F	42 M	X	Digestive + Respiratory Problems
5	Ia/178	HX17P	PT415776349	F	35 M	X	Respiratory Problems
6	Ia/220	HX98E	PT817044475	F	22 M	X	
7	Ia/122	HX02Y	PT4166961157	F	23 M	X	
8	Ia/271	HH01K	PT917383663	F	12 M	X	Respiratory Problems
9	Ia/223	HH83O	PT31883235	F	126 M	X	

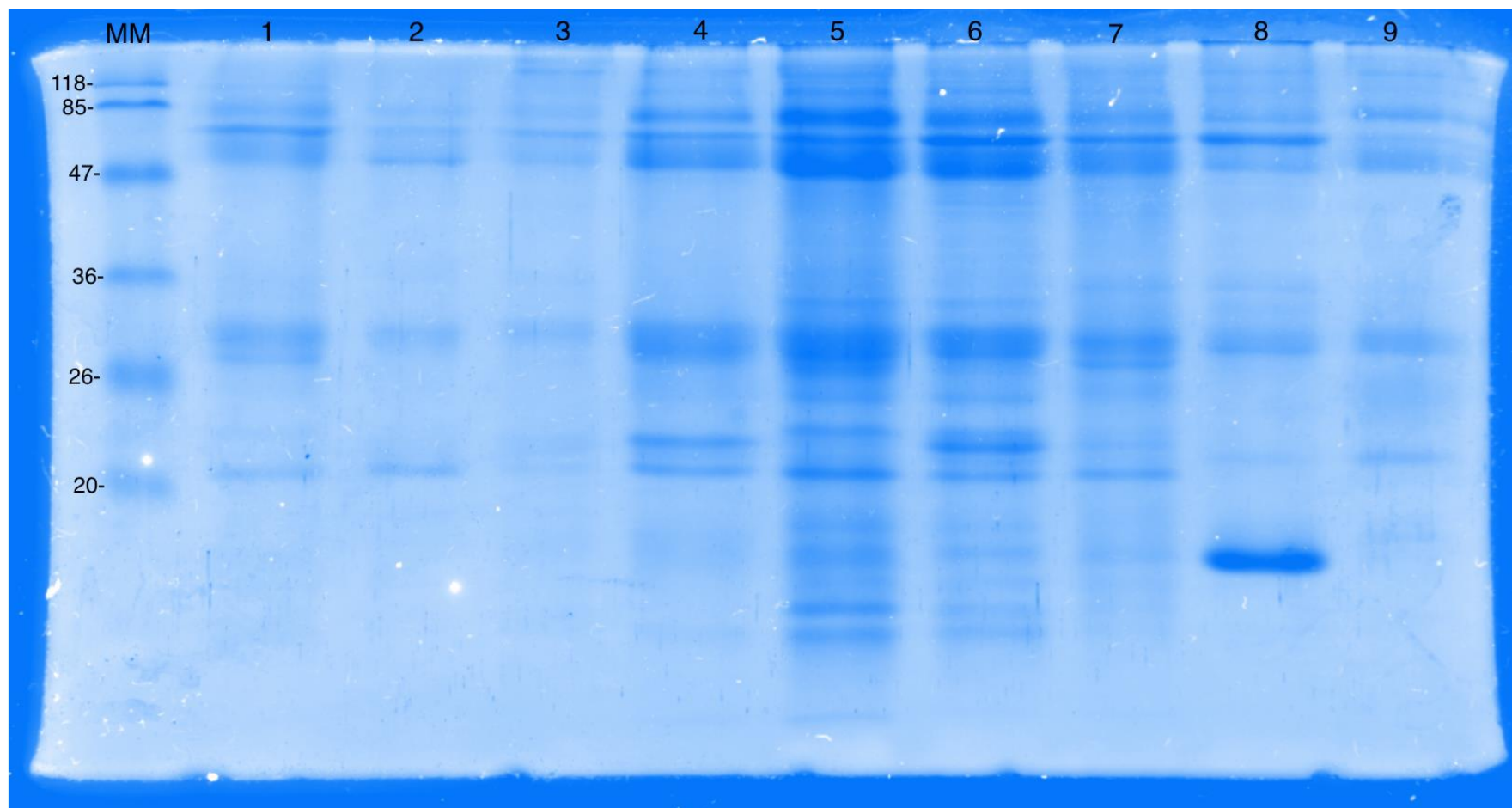


Figura 41: Gel SDS-PAGE: MM-marcador molecular Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Protein Marker, Perfil de proteínas obtido para cada amostra de saliva correspondente ao dador de acordo com a tabela 10 (poço 1 a 9).

O perfil de proteínas resultante da corrida de SDS-PAGE com as amostras de saliva armazenadas na coleção de amostras de saliva é idêntico ao apresentado por Lamy *et al.* 2008 (figura 42) o que suporta que o protocolo de recolha, acondicionamento, transporte, processamento e armazenamento desenvolvido neste trabalho se mostrou eficaz.

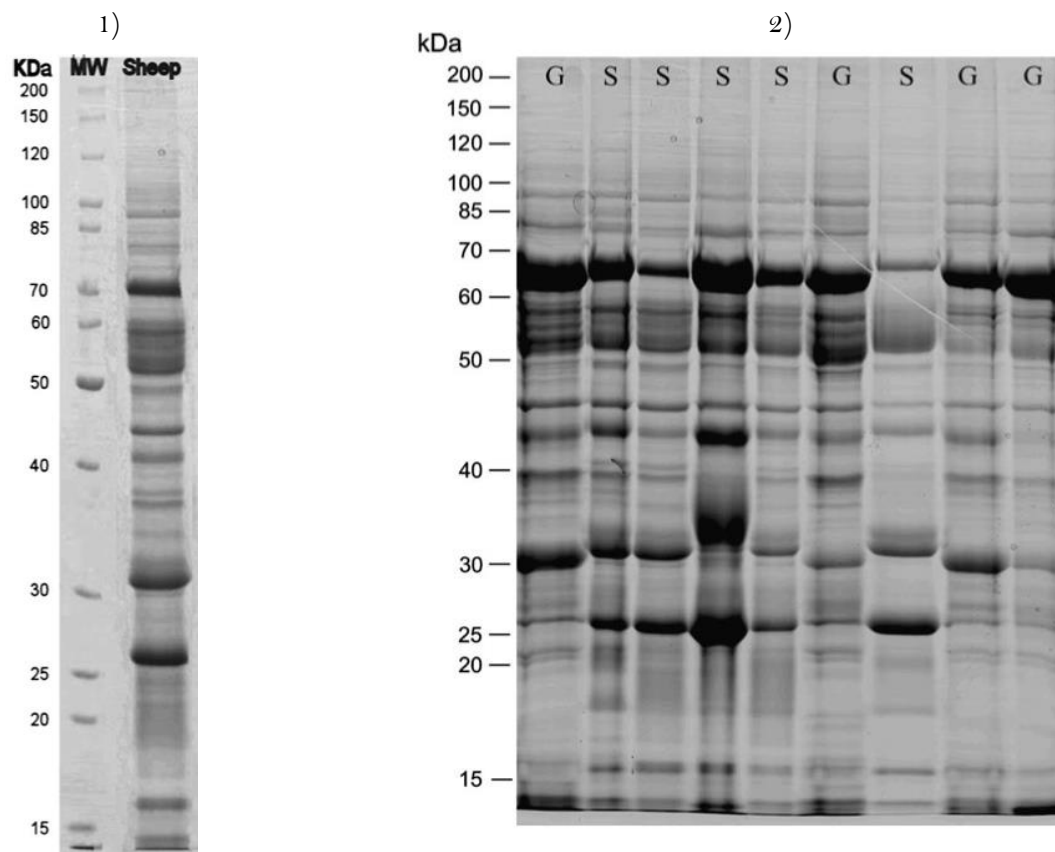


Figura 42: Avaliação dos perfis de proteínas de ovelha e cabra. 1) Perfil de proteínas de ovelha Serra da Estrela. 2) O perfil de proteínas de ovelha (S) e cabra (G) apresentado por Lamy *et al* 2008.

5. CONCLUSÕES

Atualmente a informação relativa ao proteoma de ovino permanece numa fase primordial em comparação ao conhecimento nos seres humanos. A cavidade oral é um sistema ainda pouco caracterizado também no ramo da veterinária, e com pouca abordagem por parte dos estudos científicos nesta área. Os métodos experimentais de diagnóstico molecular são a principal preocupação como meios para o diagnóstico, deixando de parte os métodos *in silico* como o estudo da proteómica em conjunto com a interatómica e as ferramentas bioinformáticas como meios não invasivos e mais simples para o utilizador. No sentido de alterar esta questão, este trabalho contribuiu para o desenvolvimento do OvisOme.

Uma das dificuldades superada foi a variabilidade dos dados gerados pelas técnicas de proteómica que apresentaram um desafio à compreensão e interpretação dos efeitos globais de cada proteína em particular. A forma de inverter esta situação passou pela criação da bases de dados OvisOme que incentive a catalogação e caracterização do proteoma com o apoio das ferramentas bioinformáticas. A cavidade oral de *Ovis aries* é caracterizada atualmente por apenas um artigo científico que estuda amostras de saliva de ovelha. Estão ao todo identificadas 27 proteínas na saliva deste animal o que mostra que ainda existe um longo caminho a percorrer até haver a cobertura de informação que permita uma análise completa da cavidade oral de ovelha como é feito atualmente em humanos através do OralOme.

Este trabalho foi também dificultado pelo facto de haver escassez de dados de quantificação das proteínas. Mesmo alguns dos estudos que quantificam as proteínas, apresentam apenas valores de quantificação qualitativa, ou seja, apresentam a proteína como estando aumentada ou diminuída em contexto de patologia.

Este trabalho permitiu identificar possíveis biomarcadores para a doença de Johne de acordo com uma análise funcional. Estas moléculas podem no futuro possam ser parte integrante de meios de diagnósticos baseados em saliva. Foram identificados dois potenciais biomarcadores (Transthyretin e Alpha-haemoglobin) sendo que um deles Transthyretin pode ser encontrado na saliva.

6. TRABALHO FUTURO

OvisOme é a base de dados criada neste trabalho. A integração de novos dados é realizada aquando de novos artigos são publicados. Deste modo as perspectivas futuros do nosso trabalho são:

1. Atualização constante do OvisOme pela recolha e revisão dos dados publicados ao nível do proteoma de ovelha;
2. Criação de uma plataforma Web com todos os dados do OvisOme disponível a toda a comunidade científica;
3. Caracterização biológica das amostras da saliva de ovelhas Serra da Estrela;
4. Investigação por métodos moleculares da possibilidade de marcador molecular na saliva da proteína Transthyretin para a doença de Johne;
5. Desenvolvimento de um método de diagnóstico em vida pelo fluido salivar em ovelhas Serra da Estrela.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Rosa, N. das N. Do Proteoma Salivar ao OralOma. (2011). at <<http://www.researchgate.net/publication/232243203>>
2. Pathade, P. & Bairagi, V. Proteomics : Opportunities and Challenges. *Int J Pharm Sci* ... **3**, 1165–1172 (2011).
3. Pleissner, K.-P. *et al.* Web-accessible proteome databases for microbial research. *Proteomics* **4**, 1305–13 (2004).
4. Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2763–88 (2009).
5. Mayeux, R. Biomarkers : Potential Uses and Limitations. **1**, 182–188 (2004).
6. Fonseca, J. F. R. Biomarcadores na Saliva - Presente e Futuro. 117 (2014).
7. Apweiler, R. *et al.* UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **32**, D115–9 (2004).
8. McCarthy, F. M. *et al.* AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics* **7**, 229 (2006).
9. Food Standards Australia New Zealand. Association Between Johne's Disease and Crohn's Disease *A Microbiological Review*. 1–21 (2005).
10. Lombard, J. E. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **27**, 525–35, v (2011).
11. Arsenault, R. J. *et al.* From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet. Res.* **45**, 54 (2014).
12. Hemalatha, S., Roy, P., Purushothaman, V. & Iyue, M. Paratuberculosis in different breeds of sheep: A retrospective study of cases. *Int. J. Mycobacteriology* **2**, 166–170 (2013).
13. Brennan, P. J. & Crick, D. C. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 475–88 (2007).

14. Bannantine, J. P. & Bermudez, L. E. No Holes Barred : Invasion of the Intestinal Mucosa by Mycobacterium avium subsp . paratuberculosis. **81**, 3960–3965 (2013).
15. Rosa, N. *et al.* From the salivary proteome to the OralOme: comprehensive molecular oral biology. *Arch. Oral Biol.* **57**, 853–64 (2012).
16. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **42**, D191–8 (2014).
17. Zhong, L., Taylor, D., Begg, D. J. & Whittington, R. J. Biomarker discovery for ovine paratuberculosis (Johne’s disease) by proteomic serum profiling. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 315–26 (2011).
18. Arrais, J. P., Lopes, P., Rosa, N. & Jose, M. From the salivary proteome to the OralOme : Comprehensive molecular oral biology. 1–12 (2012). doi:10.1016/j.archoralbio.2011.12.010
19. Pesquita, C., Faria, D., Falcão, A. O., Lord, P. & Couto, F. M. Semantic similarity in biomedical ontologies. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000443 (2009).
20. Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K. & Punyadeera, C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin. Chem.* **57**, 675–87 (2011).
21. Pillai, L. *et al.* Developing a biocuration workflow for AgBase, a non-model organism database. *Database (Oxford)*. **2012**, bas038 (2012).
22. Rathnayake, N. *et al.* Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. *PLoS One* **8**, e61356 (2013).
23. Scarano, E. *et al.* Proteomics of saliva : personal experience. 125–130 (2010).
24. Vodovotz, Y., Csete, M., Bartels, J., Chang, S. & An, G. Translational systems biology of inflammation. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000014 (2008).
25. Bannantine, J. P. & Talaat, A. M. Genomic and transcriptomic studies in Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **138**, 303–11 (2010).

26. Barrow, W. W. Processing of mycobacterial lipids and effects on host responsiveness. *Front. Biosci.* **2**, d387–400 (1997).
27. Chacon, O., Bermudez, L. E. & Barletta, R. G. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 329–63 (2004).
28. Chiodini, R. J. The History of Paratuberculosis (Johne's Disease). in *A Rev. Lit. 1895-1992* 658 (1993).
29. Collins, M. Update on paratuberculosis: 1. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Ir. Vet. J.* **56**, (2003).
30. Collins, M. Paratuberculosis: Review of present knowledge. *Acta Vet Scand* (2003). at <<http://www.johnes.org/handouts/files/CollinsMT-ReviewActaVetScand03.pdf>>
31. Fujiwara, N. Distribution, Characterization of Mycobacterial Glycolipids and Host Responses. *Biochem. Genet. Mol. Biol.* ... 101–126 (2012). at <http://cdn.intechopen.com/pdfs/39456/InTech-Distribution_characterization_of_mycobacterial_glycolipids_and_host_responses.pdf>
32. Harris, J. E. & Lammerding, A. M. Crohn's Disease and *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: Current Issues. *J. Food Prot.* **64**, 2103–2110 (2001).
33. Harris, N. B. & Barletta, R. G. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 489–512 (2001).
34. Harris, N. & Barletta, R. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 489–512 (2001).
35. Henson, B. R. Z. A Primer on Salivary Diagnostics. *Am. Dent. Association* **1-6**, (2009).
36. Hughes, V. *et al.* Immunogenicity of proteome-determined *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-specific proteins in sheep with paratuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1824–33 (2008).
37. Hughes, V. *et al.* Interferon gamma responses to proteome-determined specific recombinant proteins: potential as diagnostic markers for ovine Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **155**, 197–204 (2013).

38. Hughes, V. *et al.* Proteome-determined type-specific proteins of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* **158**, 153–62 (2012).
39. Kaufman, E. & Lamster, I. B. the Diagnostic Applications of Saliva-- a Review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13**, 197–212 (2002).
40. Kawaji, S., Nagata, R., Whittington, R. J. & Mori, Y. Detection of antibody responses against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis stress-associated proteins within 30 weeks after infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **150**, 101–11 (2012).
41. Lamy, E. *et al.* Comparison of electrophoretic protein profiles from sheep and goat parotid saliva. *J. Chem. Ecol.* **34**, 388–97 (2008).
42. Manning, E. & Collins, M. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech.* (... **20**, 133–150 (2001).
43. McKenna, S. & Keefe, G. Johne's disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can. ...* **47**, 1089–1099 (2006).
44. Mendes, S. & Boinas, F. EPIDEMIOLOGICAL STUDIES ON PARATUBERCULOSIS IN SMALL RUMINANTS IN PORTUGAL. *Epidemiol. Sante ...* 61–71 (2004). at <<http://aeema.vet-alfort.fr/public/pdf/revue/45.07.pdf>>
45. Mikkelsen, H., Aagaard, C., Nielsen, S. S. & Jungersen, G. Review of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis antigen candidates with diagnostic potential. *Vet. Microbiol.* **152**, 1–20 (2011).
46. Motiwala, A. & Amonsin, A. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates recovered from wild animal species. *J. Clin. ...* **42**, 1703–1712 (2004).
47. Nielsen, S. S. & Toft, N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* **88**, 1–14 (2009).
48. Pradhan, A. K. *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a longitudinal study of three dairy herds. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 893–901 (2011).

49. Rindi, L. & Garzelli, C. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 375–83 (2014).
50. Salem, M. *et al.* *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: an insidious problem for the ruminant industry. *Trop. Anim. Health Prod.* **45**, 351–66 (2013).
51. Stabel, J. R. Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci.* **81**, 283–8 (1998).
52. Stabel, J. R. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **77**, 465–73 (2000).
53. Stabel, J. R. Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: a complex arsenal. *Anim. Health Res. Rev.* **7**, 61–70 (2007).
54. Tessema, M. Z., Koets, a P., Rutten, V. P. & Gruys, E. How does *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis resist intracellular degradation? *Vet. Q.* **23**, 153–62 (2001).
55. Thorel, M. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Rev. Sci. ...* **20**, 204–218 (2001).
56. Tiwari, A. & VanLeeuwen, J. Johne's disease in Canada Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. ...* **47**, 874–882 (2006).
57. Vala, H. *Paratuberculosis in sheep from Serra da Estrela Region, Portugal.* 250–253 (2007).
58. Valentin-Weigand, P. & Goethe, R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect.* **1**, 1121–7 (1999).
59. Vissa, V. D. & Brennan, P. J. Minireview The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. 1–8 (2001).
60. Wiszniewska, A. & Sztejn, J. Detection methods of mycobacterium paratuberculosis. *Pol. J. Vet. Sci.* **5**, 203–207 (2001).
61. Wong, D. T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J. Am. Dent. Assoc.* **137**, 313–21 (2006).

7. ANEXOS

São disponibilizadas como anexos a lista de proteínas incluídas no OvisOme identificadas até ao momento em ovelha (**Anexo 1**), póster apresentado no IV Congresso de Veterinária (**Anexo 2**), os protocolos de recolha (**Anexo 3**) e de armazenamento (**Anexo 4**) e a tabelas de armazenamento usadas ao longo do trabalho experimental (**Anexo 5**), a tabela funcional completa (**Anexo 6**) e por fim a tabela completa das proteínas exclusivas da patologia Mastitis (**Anexo 7**).

Anexo 1: Lista de proteínas identificadas em ovelha anotadas no OvinOme.

UniProtKB AC	Sample	Health	Disease	Disease Name	Microorganism	Regulation	Breed	Citation (NCBI ID)	Biomarker
P42819	Imported UniProt	from	x	amyloidosis					
P17605	Imported UniProt	from	x	Batten disease					
Q06056	Imported UniProt	from	x	Batten disease					
Q9MZS8	Imported UniProt	from	x	Batten disease					
A2TJ54	Imported UniProt	from	x	Batten disease			New Zealand Borderdale		
Q7M2U8	Serum	x	x	Fasciolosis	Fasciola hepatica	+	Corriedale	17888928	x
Q99149	Serum		x	Fasciolosis	Fasciola hepatica	+	Corriedale	17888928	x
B6E3I8	Serum		x	Fasciolosis	Fasciola hepatica		Corriedale	17888928	x

P12725	Serum	x	x	Fasciolosis	Fasciola hepatica	+	Corriedale	17888928	x
B3VSC1	Serum		x	Fasciolosis	Fasciola hepatica	-	Corriedale	17888928	x
W5PS88	Serum	x	x	Fasciolosis	Fasciola hepatica	+	Corriedale	17888928	x
Q8MIP8	Serum		x	Fasciolosis	Fasciola hepatica	+	Corriedale	17888928	x
W5PWM0	Serum		x	Fasciolosis	Fasciola hepatica		Corriedale	17888928	x
A8VIE7	Serum	x	x	Johne Disease	<i>M. paratuberculosis</i>	+	Merino	21481470	x
P12303	Serum	x	x	Johne Disease	<i>M. paratuberculosis</i>	-	Merino	21481470	x
P51664	Imported from UniProt		x	cancer	p53				
W5P663	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5PJB6	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5QC41	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5P5W9	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5Q983	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5NRY1	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5Q216	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5NPN4	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5P9U4	Muscle	x	x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5PVU5	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
P12725	Muscle	x	x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5PF65	Muscle	x	x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
P14639	Muscle	x	x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5PIG7	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
O18751	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5QGD1	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5PJ69	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	
W5PWA8	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>			Romanov	17093219	

W5PUH7	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
W5PCW4	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
W5PFT7	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
W5PEP7	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
W5Q1L2	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
W5NYJ1	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
B7TJ13	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
W5QAE8	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
W5PH95	Muscle		x	<i>muscle hypertrophy</i>		Romanov	17093219	
W5P101	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5PQ98	Lymph		x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5P7S6	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
P29701	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
P14639	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5NX51	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5NWM 2	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5Q9A2	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5NQ46	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5Q5A6	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
F2YQ13	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5PPQ8	Lymph		x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5P0Q4	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5PSQ7	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
P81286	Lymph		x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5QAB1	Lymph		x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	
W5NXW9	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Crossbred	18384101	

W5PAM5	Lymph		x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>		Crossbred	18384101	
W5PJG0	Lymph		x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>		Crossbred	18384101	
I1WXR3	Lymph		x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>		Crossbred	18384101	
W5PF65	Lymph	x	x	nematode	<i>Teladorsagia circumcincta</i>		Crossbred	18384101	
O62848	Urine		x	kidney injury		+		22088561	
W5PKW1	Urine		x	kidney injury		+		22088561	
Q8HY31	Imported from UniProt		x	porphyria cutanea tarda			German Blackface sheep		
L8E9Q6	Serum	0,005	x	MITES	Psoroptidae	0.58		23542335	x
W5NSH8	Serum	x	x	MITES	Psoroptidae	+/-		21963943	x
P12303	Lymph	x	x	scrapie/ Ovine enzootic Paraplexia	prion		Romanov	21044301	x
P23907	Urine		x	scrapie/ Ovine enzootic Paraplexia	prion			18319425	
P23907	Imported from UniProt		x	scrapie/ Ovine enzootic Paraplexia	prion				
Q6ECI6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	5,85	Sarda sheep	23774600	
W5PHQ0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	5,65	Sarda sheep	23774600	
W5QBI9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	5,49	Sarda sheep	23774600	
Q9MZA9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	5,23	Sarda sheep	23774600	
W5P5A0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	5,18	Sarda sheep	23774600	
W5P098	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	5,07	Sarda sheep	23774600	
W5QBQ9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,88	Sarda sheep	23774600	
W5NQH6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,84	Sarda sheep	23774600	
D8X187	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,79	Sarda sheep	23774600	
W5PLV2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,79	Sarda sheep	23774600	
W5Q9T3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,14	Sarda sheep	23774600	
W5NTD9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,10	Sarda sheep	23774600	
W5PJM4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,09	Sarda sheep	23774600	

W5PJM5	Mammary tissue	x	x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,09	Sarda sheep	23774600	
W5QC99	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	4,02	Sarda sheep	23774600	
P47843	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,91	Sarda sheep	23774600	
W5PFP1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,85	Sarda sheep	23774600	
W5NRI1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,81	Sarda sheep	23774600	
W5NPK5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,81	Sarda sheep	23774600	
W5QC41	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,67	Sarda sheep	23774600	
W5PZ59	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,58	Sarda sheep	23774600	
W5P0Q4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,58	Sarda sheep	23774600	
W5P4I9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,58	Sarda sheep	23774600	
W5PIG7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,54	Sarda sheep	23774600	
W5PIN6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,51	Sarda sheep	23774600	
W5PIN4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,51	Sarda sheep	23774600	
W5PW05	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,43	Sarda sheep	23774600	
A5JSV5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,40	Sarda sheep	23774600	
B0LRN4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,40	Sarda sheep	23774600	
Q30DU4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,40	Sarda sheep	23774600	
W5QBL7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,32	Sarda sheep	23774600	
W5PQ98	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,23	Sarda sheep	23774600	
W5QG16	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,19	Sarda sheep	23774600	
W5QG17	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,19	Sarda sheep	23774600	
W5PSZ5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,16	Sarda sheep	23774600	
W5PEP7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,13	Sarda sheep	23774600	
W5P935	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,10	Sarda sheep	23774600	
W5QGD1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,05	Sarda sheep	23774600	
W5Q646	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,05	Sarda sheep	23774600	

W5NXM6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,05	Sarda sheep	23774600	
W5Q306	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	3,00	Sarda sheep	23774600	
M4WXC2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,95	Sarda sheep	23774600	
W5PMY9	Mammary tissue	x	x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,95	Sarda sheep	23774600	
W5PY64	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,90	Sarda sheep	23774600	
W5P409	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,89	Sarda sheep	23774600	
W5NY50	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,88	Sarda sheep	23774600	
W5PIY0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,78	Sarda sheep	23774600	
W5PHL7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,78	Sarda sheep	23774600	
W5PVF3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,78	Sarda sheep	23774600	
D7R7V6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,73	Sarda sheep	23774600	
W5PDG3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,73	Sarda sheep	23774600	
Q28554	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,73	Sarda sheep	23774600	
C7BDV7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,72	Sarda sheep	23774600	
Q9XT27	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,72	Sarda sheep	23774600	
W5QI04	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,66	Sarda sheep	23774600	
W5QFP2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,65	Sarda sheep	23774600	
W5NSX2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,60	Sarda sheep	23774600	
W5P1D7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,52	Sarda sheep	23774600	
W5P255	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,52	Sarda sheep	23774600	
W5Q0W2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,52	Sarda sheep	23774600	
W5PBW1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,45	Sarda sheep	23774600	
Q30DQ9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,45	Sarda sheep	23774600	
W5NUE1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,45	Sarda sheep	23774600	
A7VJC2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,45	Sarda sheep	23774600	
W5PF65	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,38	Sarda sheep	23774600	

W5Q6S0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,37	Sarda sheep	23774600	
W5PZ33	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,37	Sarda sheep	23774600	
W5PK07	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,37	Sarda sheep	23774600	
B7U168	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,37	Sarda sheep	23774600	
W5QDZ3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,33	Sarda sheep	23774600	
W5Q366	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,29	Sarda sheep	23774600	
W5QFG6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,28	Sarda sheep	23774600	
W5Q2D7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,21	Sarda sheep	23774600	
W5QFN5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,20	Sarda sheep	23774600	
W5QAA6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,20	Sarda sheep	23774600	
W5QFL9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,20	Sarda sheep	23774600	
B2LYK9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,17	Sarda sheep	23774600	
W5NZJ3	Mammary tissue	x	x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,12	Sarda sheep	23774600	
W5NVB9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,12	Sarda sheep	23774600	
W5NZ74	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,12	Sarda sheep	23774600	
B2MVX0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,10	Sarda sheep	23774600	
W5P4P3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,03	Sarda sheep	23774600	
W5P7P8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,03	Sarda sheep	23774600	
P12725	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,02	Sarda sheep	23774600	
W5QHx9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,02	Sarda sheep	23774600	
W5PBY1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,02	Sarda sheep	23774600	
W5PG71	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	2,02	Sarda sheep	23774600	
P54230	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,97	Sarda sheep	23774600	
W5P6Q5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,96	Sarda sheep	23774600	
W5PR51	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,92	Sarda sheep	23774600	
W5P7Q0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,92	Sarda sheep	23774600	

W5NY01	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,92	Sarda sheep	23774600	
W5PPT6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,92	Sarda sheep	23774600	
W5PV69	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,88	Sarda sheep	23774600	
W5NQK9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,86	Sarda sheep	23774600	
W5Q6F0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,85	Sarda sheep	23774600	
W5NTA0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,82	Sarda sheep	23774600	
Q6YNC8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,82	Sarda sheep	23774600	
P30358	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,81	Sarda sheep	23774600	
Q5MIB5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,81	Sarda sheep	23774600	
O02849	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,81	Sarda sheep	23774600	
W5NQA0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,81	Sarda sheep	23774600	
W5PWA8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,78	Sarda sheep	23774600	
W5PV69	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,76	Sarda sheep	23774600	
W5PDD0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,76	Sarda sheep	23774600	
W5Q5K9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,75	Sarda sheep	23774600	
W5PDQ0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,73	Sarda sheep	23774600	
C8BKD6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,72	Sarda sheep	23774600	
P60713	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,69	Sarda sheep	23774600	
W5P1G7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,69	Sarda sheep	23774600	
W5PL19	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,69	Sarda sheep	23774600	
W5PD78	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,69	Sarda sheep	23774600	
P50415	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,67	Sarda sheep	23774600	
D0VWZ0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PR81	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,63	Sarda sheep	23774600	
W5P684	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,60	Sarda sheep	23774600	
W5QGB5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	

W5QFQ2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5QFP4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5PHL0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5PHH3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5QFR6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5QFN7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5QFN3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5PHM4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5QFN8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,59	Sarda sheep	23774600	
W5NZJ6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,58	Sarda sheep	23774600	
W5QBM5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,56	Sarda sheep	23774600	
W5PZI1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,55	Sarda sheep	23774600	
W5P824	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,55	Sarda sheep	23774600	
W5PL89	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,53	Sarda sheep	23774600	
C5ISA2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,52	Sarda sheep	23774600	
W5Q6H1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	1,52	Sarda sheep	23774600	
W5QAY5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,53	Sarda sheep	23774600	
W5QED8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,53	Sarda sheep	23774600	
A9YTX7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,53	Sarda sheep	23774600	
P81605	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,53	Sarda sheep	23774600	
W5Q0L1	Mammary tissue	x	x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,54	Sarda sheep	23774600	
P62262	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,54	Sarda sheep	23774600	
W5PDR1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,54	Sarda sheep	23774600	
W5NUV1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,57	Sarda sheep	23774600	

W5NUU9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,58	Sarda sheep	23774600	
W5NSD5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,58	Sarda sheep	23774600	
W5P645	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,59	Sarda sheep	23774600	
W5PMU0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,59	Sarda sheep	23774600	
W5PF71	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,59	Sarda sheep	23774600	
W5Q501	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,62	Sarda sheep	23774600	
W5Q4P4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,64	Sarda sheep	23774600	
W5Q9B2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,64	Sarda sheep	23774600	
W5Q5V0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5P1X5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5QCJ3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5Q4S3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PDB9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5QEZ0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PVP5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PKP6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PMA6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PP77	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
P68240	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PUJ4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	

W5PAG0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5P633	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5QB61	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5QD49	Mammary tissue	x	x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5NQQ8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5NYA8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5NPI2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5QIA8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PQK3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PDU8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PV64	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
Q28542	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5QCB7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5P9U4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5QIY3	Mammary tissue	x	x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PI22	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5NS51	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PQL6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5P458	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5PN75	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	

W5PPH9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5QCP8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,65	Sarda sheep	23774600	
W5P5C1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,67	Sarda sheep	23774600	
W5P561	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,68	Sarda sheep	23774600	
M4WED3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,70	Sarda sheep	23774600	
W5NYA9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,70	Sarda sheep	23774600	
W5P1W2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,71	Sarda sheep	23774600	
C5IJ83	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,73	Sarda sheep	23774600	
Q717R8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,73	Sarda sheep	23774600	
Q009B1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,73	Sarda sheep	23774600	
W5QFH5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,73	Sarda sheep	23774600	
W5QFK5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,76	Sarda sheep	23774600	
C5IWU0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,78	Sarda sheep	23774600	
W5QCI3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,78	Sarda sheep	23774600	
W5Q575	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,79	Sarda sheep	23774600	
W5Q1R8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,80	Sarda sheep	23774600	
W5QGC4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,80	Sarda sheep	23774600	
W5PK26	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,82	Sarda sheep	23774600	
W5PRJ4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,83	Sarda sheep	23774600	
W5PMX7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,84	Sarda sheep	23774600	

P80190	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,87	Sarda sheep	23774600	
W5PN74	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,88	Sarda sheep	23774600	
Q6Q312	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5P2M4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5Q7Q6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PRW3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PSB5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PP18	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PXX7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
Q9MYX6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PTE6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5P641	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PUU0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5Q4B6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PP48	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5QHL5	Mammary tissue	x	x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5QHN1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5NU00	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
Q9XT28	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5Q7N4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	

W5QI49	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PR48	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5NWU0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5Q9A8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5Q9A9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5PHQ8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5NSB2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,89	Sarda sheep	23774600	
W5NZY6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,90	Sarda sheep	23774600	
B2LYL3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,90	Sarda sheep	23774600	
W5NYA7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,90	Sarda sheep	23774600	
W5Q4K1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,90	Sarda sheep	23774600	
W5Q2D9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,90	Sarda sheep	23774600	
W5QEJ5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,91	Sarda sheep	23774600	
W5PL88	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,91	Sarda sheep	23774600	
W5NUE3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,91	Sarda sheep	23774600	
W5PNM6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,91	Sarda sheep	23774600	
W5PMC5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,94	Sarda sheep	23774600	
W5Q0M7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,95	Sarda sheep	23774600	
C5IWU1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,97	Sarda sheep	23774600	
W5Q3W4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 1,98	Sarda sheep	23774600	

C5IJ99	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,00	Sarda sheep	23774600	
W5NUH1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,00	Sarda sheep	23774600	
W5NPT7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,00	Sarda sheep	23774600	
C5IJ88	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,01	Sarda sheep	23774600	
B0FZM0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,03	Sarda sheep	23774600	
W5P1I7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,09	Sarda sheep	23774600	
W5PFU1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5PEV6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5Q1V1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5Q831	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5PV71	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5PV70	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5PS11	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5Q3D2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5P4S2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5PUR8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5Q354	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5QH00	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5PMF3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5P929	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	

J9UP74	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5PDZ6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,10	Sarda sheep	23774600	
W5QBQ8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,11	Sarda sheep	23774600	
W5QD52	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,11	Sarda sheep	23774600	
W5PYG8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,11	Sarda sheep	23774600	
W5P3J0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,11	Sarda sheep	23774600	
W5PZ65	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,11	Sarda sheep	23774600	
W5PTW5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,11	Sarda sheep	23774600	
W5PTW6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,11	Sarda sheep	23774600	
W5QCV4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,12	Sarda sheep	23774600	
W5QER2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,13	Sarda sheep	23774600	
W5Q3E3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,14	Sarda sheep	23774600	
W5QFH6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,18	Sarda sheep	23774600	
W5NUM7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,18	Sarda sheep	23774600	
W5QFH7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,20	Sarda sheep	23774600	
W5PLV3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,20	Sarda sheep	23774600	
W5PBM0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,20	Sarda sheep	23774600	
W5NV76	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,20	Sarda sheep	23774600	
K4P1S5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,26	Sarda sheep	23774600	
W5QIW7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,26	Sarda sheep	23774600	

W5NRD1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,27	Sarda sheep	23774600	
W5NVE5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,27	Sarda sheep	23774600	
B1A8Z2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,27	Sarda sheep	23774600	
W5PRI1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,27	Sarda sheep	23774600	
W5P3L4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5P7E2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5P2U9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5PTS8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5NPI6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5NX15	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5PQV5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5NWR4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5PPT8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
B2LU26	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,28	Sarda sheep	23774600	
W5P7A1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,31	Sarda sheep	23774600	
W5PU19	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,34	Sarda sheep	23774600	
P82197	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,34	Sarda sheep	23774600	
W5NQ34	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,34	Sarda sheep	23774600	
W5QFQ0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,35	Sarda sheep	23774600	
W5QFQ1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,35	Sarda sheep	23774600	

W5QFN9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,35	Sarda sheep	23774600	
W5Q1R1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,36	Sarda sheep	23774600	
W5P6P2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,37	Sarda sheep	23774600	
W5P6P4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,37	Sarda sheep	23774600	
W5PJX0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,43	Sarda sheep	23774600	
W5PJX1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,43	Sarda sheep	23774600	
W5PL47	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,43	Sarda sheep	23774600	
W5PX03	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,43	Sarda sheep	23774600	
W5PNV5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,43	Sarda sheep	23774600	
W5NQL2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,44	Sarda sheep	23774600	
W5NS59	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,44	Sarda sheep	23774600	
W5NW17	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,44	Sarda sheep	23774600	
W5P5K7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,44	Sarda sheep	23774600	
W5QGX9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,45	Sarda sheep	23774600	
W5NUN8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,46	Sarda sheep	23774600	
W5PU40	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,46	Sarda sheep	23774600	
W5PN31	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,46	Sarda sheep	23774600	
W5P0V6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,47	Sarda sheep	23774600	
W5PN84	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,51	Sarda sheep	23774600	
B2ZHC0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,55	Sarda sheep	23774600	

W5NQ14	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,57	Sarda sheep	23774600	
W5P765	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5NTE8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5Q8Q6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5PGC5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5PQF8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
Q8HY29	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5NQL3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5PUV3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5PZ56	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5QH68	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5NV10	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,58	Sarda sheep	23774600	
W5PXU2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,64	Sarda sheep	23774600	
W5QB95	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,66	Sarda sheep	23774600	
W5QGN0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,69	Sarda sheep	23774600	
W5Q7Z7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,70	Sarda sheep	23774600	
Q5G2C3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,71	Sarda sheep	23774600	
Q5G2C4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,71	Sarda sheep	23774600	
W5PHP4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,71	Sarda sheep	23774600	
W5QFZ3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,71	Sarda sheep	23774600	

W5P2W9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,71	Sarda sheep	23774600	
W5NWP4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,71	Sarda sheep	23774600	
W5Q983	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,72	Sarda sheep	23774600	
W5P9M3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,72	Sarda sheep	23774600	
S4TZR5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,76	Sarda sheep	23774600	
W5PFW3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,76	Sarda sheep	23774600	
W5Q8J9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,76	Sarda sheep	23774600	
W5PCT4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,83	Sarda sheep	23774600	
W5P1G5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,83	Sarda sheep	23774600	
W5NTJ6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,83	Sarda sheep	23774600	
W5P5S1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,83	Sarda sheep	23774600	
W5NS57	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,84	Sarda sheep	23774600	
W5PRT0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,84	Sarda sheep	23774600	
W5Q024	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,84	Sarda sheep	23774600	
W5PDZ5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,84	Sarda sheep	23774600	
W5PUU2	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,84	Sarda sheep	23774600	
B2LT65	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,88	Sarda sheep	23774600	
W5PZT4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,90	Sarda sheep	23774600	
W5Q7R8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,93	Sarda sheep	23774600	
W5QHD8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,94	Sarda sheep	23774600	

W5Q8A7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,95	Sarda sheep	23774600	
W5P4C0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,96	Sarda sheep	23774600	
W5PQC5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,96	Sarda sheep	23774600	
E9K9T6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 2,99	Sarda sheep	23774600	
W5QJ50	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,05	Sarda sheep	23774600	
W5PZC7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,05	Sarda sheep	23774600	
W5PF02	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,05	Sarda sheep	23774600	
W5QH60	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,08	Sarda sheep	23774600	
W5PY10	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,08	Sarda sheep	23774600	
W5P6B3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,12	Sarda sheep	23774600	
W5PBP1	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,14	Sarda sheep	23774600	
W5QGA4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,14	Sarda sheep	23774600	
W5PAM5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,15	Sarda sheep	23774600	
W5QEL8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,23	Sarda sheep	23774600	
W5P381	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,23	Sarda sheep	23774600	
W5PV56	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,24	Sarda sheep	23774600	
W5PP04	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,24	Sarda sheep	23774600	
W5PMV0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,24	Sarda sheep	23774600	
W5PMU9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,24	Sarda sheep	23774600	
W5PMU4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,24	Sarda sheep	23774600	

W5PH51	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,24	Sarda sheep	23774600	
W5QG75	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,28	Sarda sheep	23774600	
W5PB37	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,32	Sarda sheep	23774600	
W5NRB0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,32	Sarda sheep	23774600	
W5PM94	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,40	Sarda sheep	23774600	
W5PS49	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,43	Sarda sheep	23774600	
W5QEY8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,48	Sarda sheep	23774600	
W5PSW9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,54	Sarda sheep	23774600	
Q6Q311	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,55	Sarda sheep	23774600	
W5P114	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,62	Sarda sheep	23774600	
W5PLY3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,63	Sarda sheep	23774600	
W5PCL4	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,65	Sarda sheep	23774600	
W5PPH6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,65	Sarda sheep	23774600	
W5P363	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,68	Sarda sheep	23774600	
W5PU75	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,68	Sarda sheep	23774600	
W5QIK8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,68	Sarda sheep	23774600	
C5IJ89	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,69	Sarda sheep	23774600	
W5P2Q6	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,69	Sarda sheep	23774600	
W5QGX7	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,74	Sarda sheep	23774600	
B2MVW5	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,81	Sarda sheep	23774600	

W5NYP8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,95	Sarda sheep	23774600	
W5PUK3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 3,98	Sarda sheep	23774600	
W5QH64	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,03	Sarda sheep	23774600	
P53791	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,21	Sarda sheep	23774600	
W5NU39	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,22	Sarda sheep	23774600	
W5Q8J3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,26	Sarda sheep	23774600	
W5QDG8	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,39	Sarda sheep	23774600	
W5Q675	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,43	Sarda sheep	23774600	
W5PQE9	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,67	Sarda sheep	23774600	
W5PZ94	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,69	Sarda sheep	23774600	
W5Q2V0	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,70	Sarda sheep	23774600	
W5NVT3	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 4,93	Sarda sheep	23774600	
Q28559	Mammary tissue		x	Mastitis	<i>S. Uberis</i>	- 5,71	Sarda sheep	23774600	
W5NY50	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	5.27		21690237	
A2TJJ2	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	5.11		21690237	
W5QBQ9	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	4.98		21690237	
P79360	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	4.68		21690237	
D7R7V6	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	4.62		21690237	
W5PDG3	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	4.62		21690237	
Q28554	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	4.62		21690237	
W5PLV2	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	4.37		21690237	
W5P409	Milk		x	Mastitis	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	3.90		21690237	

DoVWY9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.86		21690237	
W5NQH6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.80		21690237	
W5QBI9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.30		21690237	
P54230	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.17		21690237	
W5NUS5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.17		21690237	
W5PHQ0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.09		21690237	
W5P935	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.08		21690237	
W5QIV1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.08		21690237	
W5PZ59	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	3.00		21690237	
W5P7Q3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.99		21690237	
B7U168	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.99		21690237	
W5PSZ5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.91		21690237	
W5PLB7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.65		21690237	
W5Q5R5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.65		21690237	
W5PEC5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.65		21690237	
W5NTA0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.64		21690237	
W5QAX3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.64		21690237	
F2YQ13	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.57		21690237	
W5QHU9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.52		21690237	
W5PHK5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.41		21690237	
W5QFQ1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.41		21690237	
W5QFQ0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.41		21690237	
W5PIY0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.37		21690237	
B7P027	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.21		21690237	
Q30DQ9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.21		21690237	
W5NUK4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.21		21690237	

W5PLC2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.16		21690237	
P11839	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.16		21690237	
W5NQK9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.16		21690237	
W5PHW0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.16		21690237	
W5PY10	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.09		21690237	
W5NX51	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.04		21690237	
W5NSD5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.04		21690237	
W5PJM4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.03		21690237	
W5PJM5	Milk	x	x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.03		21690237	
W5NYZ5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.03		21690237	
W5P3K5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	2.03		21690237	
B2ZA85	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.83		21690237	
W5P114	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.83		21690237	
W5PQR5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.80		21690237	
W5PFP1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.65		21690237	
D3G9G3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.65		21690237	
R9QXS6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.65		21690237	
Q5MJE8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.65		21690237	
W5QFQ8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.61		21690237	
W5QAH2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.61		21690237	
W5Q9Y2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.61		21690237	
W5NR98	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.61		21690237	
W5QA24	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.61		21690237	
W5NRX3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.61		21690237	
W5NS71	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.61		21690237	
W5NR06	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.61		21690237	

W5PTA0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.58		21690237	
Q6B7M7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.58		21690237	
W5Q9P7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.58		21690237	
W5QFP2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.58		21690237	
K4P221	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.57		21690237	
W5PZM9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.57		21690237	
W5NPN4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.54		21690237	
W5PSC1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.53		21690237	
W5Q4E1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.36		21690237	
W5P5B2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.29		21690237	
W5P0V5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.29		21690237	
W5P765	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.29		21690237	
W5QFH5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.29		21690237	
W5NXM4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.27		21690237	
W5PTR5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.19		21690237	
W5Q5G8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	1.01		21690237	
B2LYK6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.99		21690237	
W5QC41	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.98		21690237	
W5PSQ7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.95		21690237	
W5Q3N1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.93		21690237	
W5PBM0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.93		21690237	
W5NXW9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.89		21690237	
W5PNM3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.81		21690237	
W5PPQ8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.81		21690237	
W5PJG7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.74		21690237	
W5QHP3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.74		21690237	

P02669	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.64		21690237	
P04653	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.63		21690237	
W5NRI1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.63		21690237	
W5NPK5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.63		21690237	
W5Q9P7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.45		21690237	
Q6B7M7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.45		21690237	
W5P5T8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.45		21690237	
W5P374	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.45		21690237	
W5P3J0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.45		21690237	
P62262	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.28		21690237	
W5P6P2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.16		21690237	
W5P6P4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.16		21690237	
W5PUH4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.08		21690237	
W5PSW9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.08		21690237	
W5PE01	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.08		21690237	
W5PLV3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	0.01		21690237	
A2SW69	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.03		21690237	
W5QA51	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.09		21690237	
W5Q9W2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.09		21690237	
W5PEC5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.21		21690237	
W5P601	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.35		21690237	
W5QGJ0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.40		21690237	
W5QGJ2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.40		21690237	
C8BKD6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.40		21690237	

W5PNM6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.45		21690237	
W5Q3W4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.45		21690237	
W5Q2D9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.47		21690237	
W5PMQ4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.49		21690237	
W5Q6N3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.60		21690237	
C5IJ83	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.66		21690237	
W5P2U6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5QGB5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5QFQ2	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5QFP4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5PHL0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5PHH3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5QFR6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5QFN7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5QFN3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5PHM4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5QFN8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
W5P4Z8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.69		21690237	
E9K9T6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.72		21690237	
W5PMM7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.81		21690237	

C6JUQ0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.81		21690237	
E4WMC1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.83		21690237	
E7BQS8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.83		21690237	
W5P7A1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.91		21690237	
C5IWT0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.93		21690237	
W5PU75	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.93		21690237	
P67976	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 0.94		21690237	
W5Q532	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.00		21690237	
W5NUH1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.14		21690237	
W5NUU9	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.14		21690237	
W5NUV1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.14		21690237	
W5PH95	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.14		21690237	
W5P645	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.22		21690237	
W5NPN4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.27		21690237	
W5NU39	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.32		21690237	
W5QCD6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.54		21690237	
Q6XUZ5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.54		21690237	
Q7M2U8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.63		21690237	
W5QCI3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.63		21690237	
W5PN84	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.75		21690237	

W5NUH1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.76		21690237	
W5PMX7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.76		21690237	
P00349	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 1.83		21690237	
W5PQH0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.09		21690237	
W5QBQ8	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.09		21690237	
W5Q438	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.11		21690237	
W5PU19	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.19		21690237	
W5PZ94	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.45		21690237	
W5NUE3	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.59		21690237	
W5PBW1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.67		21690237	
W5NPT7	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.70		21690237	
W5QFH5	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.73		21690237	
W5NQ46	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.80		21690237	
W5QEU6	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.81		21690237	
A6ZE99	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.89		21690237	
G5CC04	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 2.91		21690237	
W5PZI1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 3.22		21690237	
W5PCL4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 3.31		21690237	
W5QCV4	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 3.39		21690237	
W5PMT0	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 3.59		21690237	

Q009B1	Milk		x	Mastitis	Mycoplasma agalactiae	- 5.19		21690237	
P60713	Saliva	x						19615390	
P12725	Saliva	x	x					19615390	
W5PSZ5	Saliva	x						19615390	
W5NX51	Saliva	x	x					19615390	
W5NWM 2	Saliva	x	x					19615390	
P54230	Saliva	x						19615390	
P50415	Saliva	x						19615390	
W5NV76	Saliva	x						19615390	
P11937	Saliva	x						19615390	
Q5MJE8	Saliva	x						19615390	
W5PF65	Saliva	x	x					19615390	
W5PTG9	Saliva	x						19615390	
D8X187	Saliva	x						19615390	
W5P3I5	Saliva	x						19615390	
P14639	Saliva	x	x					19615390	
P08060	Saliva	x						19615390	
W5PZI1	Saliva	x						19615390	
G3LUQ4	Saliva	x						19615390	
P67976	Saliva	x						19615390	
L0BB45	Saliva	x						19615390	
P02669	Saliva	x						19615390	
E4WMC1	Saliva	x						19615390	
E7BQS8	Saliva	x						19615390	
E4WMC0	Saliva	x						19615390	
W5P0X0	Saliva	x						19615390	

P68240	Saliva	x						19615390	
P12303	Saliva	x	x					19615390	
P12725	Serum	x	x				Comisana	22630135	
W5P7S6	Serum	x	x				Comisana	22630135	
W5P101	Serum	x	x				Comisana	22630135	
W5P1J8	Serum	x					Comisana	22630135	
O02762	Serum	x					Comisana	22630135	
Q9XT27	Serum	x					Comisana	22630135	
Q9MZD9	Serum	x					Comisana	22630135	
W5NXP6	Serum	x					Comisana	22630135	
O62772	Serum	x					Comisana	22630135	
P29701	Serum	x	x				Comisana	22630135	
W5P101	Serum	x	x				Comisana	22630135	
W5Q5H8	Serum	x					Comisana	22630135	
F2YQ13	Serum	x	x				Comisana	22630135	
W5P0Q4	Serum	x	x				Comisana	22630135	
P02075	Serum	x					Comisana	22630135	
Q28745	Serum	x					Comisana	22630135	
W5NRG7	Serum	x					Comisana	22630135	
W5Q0X5	Serum	x					Comisana	22630135	
P12663	Serum	x					Comisana	22630135	
P14639	Serum	x	x				Comisana	22630135	
O18780	Serum	x					Comisana	22630135	
P12303	Serum	x	x				Comisana	22630135	
W5PJ97	Serum	x					Comisana	22630135	
W5PTG9	Serum	x					Comisana	22630135	

W5Q9A2	Serum	x	x			Comisana	22630135	
W5PJZ1	Serum	x				Comisana	22630135	
W5NY46	Serum	x				Comisana	22630135	
W5Q0X5	Serum	x				Comisana	22630135	
P29701	Serum	x	x			Comisana	22630135	
F2YQ13	Serum	x	x			Comisana	22630135	
W5PSQ7	Serum	x	x			Comisana	22630135	
W5NXW9	Serum	x	x			Comisana	22630135	
W5NX51	Serum	x	x			Comisana	22630135	
W5Q093	Serum	x				Comisana	22630135	
Q28557	Serum	x				Comisana	22630135	
P20757	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	
P29701	Cerebrospinal fluid	x	x			Clun Forest	16619304	
P12725	Cerebrospinal fluid	x	x			Clun Forest	16619304	
W5PZI1	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	
Q7M2U8	Cerebrospinal fluid	x	x			Clun Forest	16619304	
Q9XSM0	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	
P12303	Cerebrospinal fluid	x	x			Clun Forest	16619304	
P02075	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	
P68240	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	
P14639	Cerebrospinal fluid	x	x			Clun Forest	16619304	
W5PXU6	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	
Q5MJE8	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	
D3G9G3	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	
W5PF65	Cerebrospinal fluid	x	x			Clun Forest	16619304	
P09670	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304	

Q9XSM0	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304
W5NX51	Cerebrospinal fluid	x	x			Clun Forest	16619304
W5NZ47	Cerebrospinal fluid	x				Clun Forest	16619304
W5NSA6	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PTV7	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
Q2TCH3	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
Q9GL10	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PNV3	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
P14639	Seminal Plasma	x	x			Merino	23748023
W5NX51	Seminal Plasma	x	x			Merino	23748023
W5QDY5	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q3V3	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PWF2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q9A2	Seminal Plasma	x	x			Merino	23748023
W5PBA2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PPP4	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PFH1	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
O46544	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5NZX8	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QGG6	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P765	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PXX7	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PQF0	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
Q3T930	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PUT6	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
P17698	Seminal Plasma	x				Merino	23748023

W5PPD3	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
P83205	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QGT1	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PSK0	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QI29	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q2D8	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5NVG2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PXE0	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P2V0	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QH54	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5NU21	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PJ21	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PTH1	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q1M0	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PS88	Seminal Plasma	x	x			Merino	23748023
W5P323	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QDD0	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P440	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P3C6	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q701	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PUM8	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P655	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
A8DR93	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PHW0	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PGB2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PVL5	Seminal Plasma	x				Merino	23748023

W5PTR5	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PSK1	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P7S2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q8N2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PGP1	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PFP1	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5NWN2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PRU5	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QGM9	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5NZL3	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q9H0	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q8P8	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5NW97	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5NSH8	Seminal Plasma	x	x			Merino	23748023
W5PS94	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P1C2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5NYA7	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PVY5	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PG09	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q8X9	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PXF5	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P9U4	Seminal Plasma	x	x			Merino	23748023
W5Q7C7	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QIY3	Seminal Plasma	x	x			Merino	23748023
B6EBS6	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PZ65	Seminal Plasma	x				Merino	23748023


W5P8Z3	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q2N2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P0T8	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
B7VBV2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
A4GZY3	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P7W2	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
P47843	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
P07846	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P375	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PF65	Seminal Plasma	x	x			Merino	23748023
C8BKC3	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P4L9	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QEK4	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5Q5R9	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5P621	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5PRJ4	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
W5QG19	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
P62262	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
P29361	Seminal Plasma	x				Merino	23748023
B0LKP0	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5Q5A7	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
P25690	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
E3VW78	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
B0LKP1	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
E3VW79	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905

							Corriedale)		
B0LKP2	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
W5Q288	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
P15241	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
E3VW85	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
E3VW87	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
P25691	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
Q9TSF0	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
Q6S343	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
B6V764	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
Q29618	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
A8WEL6	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
Q28576	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
W5Q2K8	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
C0LJE1	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
Q02958	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
U3MSX0	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
F5AY98	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
C9EI13	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	
C9EI15	Wool	x					Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905	

C9EI19	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5PRI9	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5PXU1	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5PXU0	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5Q687	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5Q611	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
O77727	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5Q5M3	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5Q6E8	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5Q5I3	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
D6R7I9	Wool	x				Crossbred (Merino, Romney and Corriedale)	22480905
W5NQ46	Lymph	x	x			Romanov	14997497
W5PF65	Lymph	x	x			Romanov	14997497
W5PHR9	Lymph	x				Romanov	14997497
P68240	Lymph	x				Romanov	14997497
W5PN18	Lymph	x				Romanov	14997497
P14639	Lymph	x	x			Romanov	14997497
W5PZS7	Lymph	x				Romanov	14997497
P29701	Lymph	x	x			Romanov	14997497
P02075	Lymph	x				Romanov	14997497
W5NX51	Lymph	x	x			Romanov	14997497
W5Q5A6	Lymph	x	x			Romanov	14997497
W5PHR9	Lymph	x				Romanov	14997497

Q5MJE8	Eye fluid	x						22025569	
Q29431	Eye fluid	x						22025569	
W5NUS5	Eye fluid	x						22025569	

Anexo 2: Póster apresentado no IV Congresso de Veterinária




UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

OvinOralOme: *Ovis aries* oral proteome database

Esteves E^{1,2}, Rosa N¹, Correia MJ¹, Vala H^{3,4}, Barros M¹

1 Departamento de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Católica Portuguesa, Viseu, Portugal;
 2 Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal;
 3 Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal;
 4 Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal



Introduction

The present study aims to develop a database transferring the methodology used in humans to the storage and cataloguing of proteins present in the oral cavity and other tissues of *Ovis aries*. This database will be essential to develop diagnosis methods to be applied to living animals targeting the most prevalent diseases affecting the stock in Serra da Estrela region.

Saliva collection method developed specifically for veterinary use




Figure 1. Serra da Estrela breed sheep




Figure 2. Sterile tube (50ml) for storage of cotton roll




Figure 3. Grab the cotton roll with the forceps




Figure 3. Rub the cotton roll in the oral vestibule area between the inferior alveolar dental arcade




Figure 4. Place the cotton roll in tube

Information available for each sample collected and stored in Biobank

Table 1. Example of sample catalog

Sample ID	Sex	Age	Weight (kg)	Height (cm)	Color	Other diseases	Salivary protein profile	Storage	Storage date	Storage location
Ia/133	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/134	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/135	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/136	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/137	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/138	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/139	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/140	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/141	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/142	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/143	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/144	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/145	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/146	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/147	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/148	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/149	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1
Ia/150	Female	12.16	14.16	10.16	White			2019-01-15	2019-01-15	Lab 1

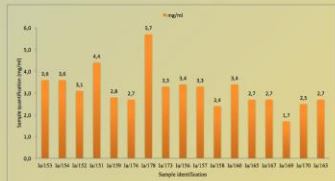


Chart 1. Protein quantification by Micro BCA Protein assay kit (Pierce)

Saliva protein profile

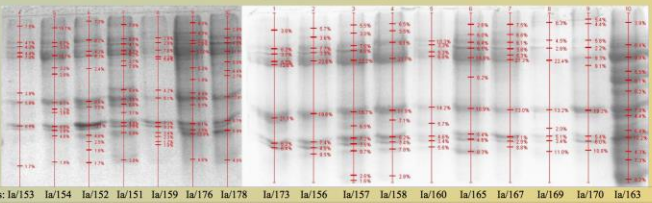


Figure 6. SDS-PAGE gel image with protein profile in different ovine saliva samples. Analysis performed by Quantity One 1-D Analysis Software (BioRad)

OvinOralOme database

The development of this database involves the manual compilation and review of the proteins identified in different studies, relative to *Ovis aries*, with the annotation of the sample characterization and proteomics techniques used.

Table 2. Database filling example


UniProtKB/AC	Name	Organism	Microorganism	Saliva	Blood	Milk	Mammary tissue	Health	Disease (MeSH ID)	Regulation	Age group	Gender	Methods of Sampling	Methods of Analysis	Type of Study	Biomarker	Citation (NCBI ID)	Obs.
P8111	Actin cytoplasmic 3	ovis aries		x								Female	Saliva was collected through a sponge from the periodontal space. The sample is stored in a sterile tube.	Quantification of the protein (BCA) and identification of the differentially expressed proteins (2D electrophoresis).	Proteomics		1963390	
Q7T8T	TubB_2	ovis aries	M. avium subsp. paratuberculosis		x			x	080103	6,177		Female	Saliva was collected by spontaneous excretion.	Saliva was collected by spontaneous excretion. The sample is stored in a sterile tube.	Proteomics	Salivary protein	2368801	
Q7Q90	Epithelial protein	ovis aries	M. avium subsp. paratuberculosis		x			x	080103	6,333		Female	Saliva was collected by spontaneous excretion. The sample is stored in a sterile tube.	Saliva was collected by spontaneous excretion. The sample is stored in a sterile tube.	Proteomics	Salivary protein	2368801	

References

1. Rosa, N. et al. From the salivary proteome to the OralOme: comprehensive molecular oral biology. *Arch. Oral Biol.* 57, 833-844 (2012).
2. McCarthy, E. et al. High-throughput functional modeling in agricultural organisms. *Nucleic Acids Res.* 39, D407-D410 (2011).
3. Lemos, E. et al. Sheep and goat saliva proteome analysis: a useful tool for diagnostic and research? *Protein. Bull.* 39, 397-401 (2009).
4. Lemos, E. et al. Effect of condensed tannin ingestion on sheep and goat periodontal proteome. *J. Agric. Food Res.* 1, 1-10 (2011).
5. Rajan, V. et al. Infection-gene responses to proteome-determined specific recombinant proteins: potential as diagnostic markers for ovine Johne's disease. *Int. Immun.* 15, 197-204 (2003).
6. Park, W. et al. Proteomic analysis of host feeding response to ovine saliva. *J. Plant Physiol.* 168, 906-9 (2011).

Contact: Marlene Barros
mbarros@crb.ucp.pt

Acknowledgments: CILDETS (PEst-C6/CEDEU46216)



Anexo 3: Protocolo de colheita de saliva

Material:



Rolhões



Pinça hemostática



Tubos de 50 ml



Bata e luvas

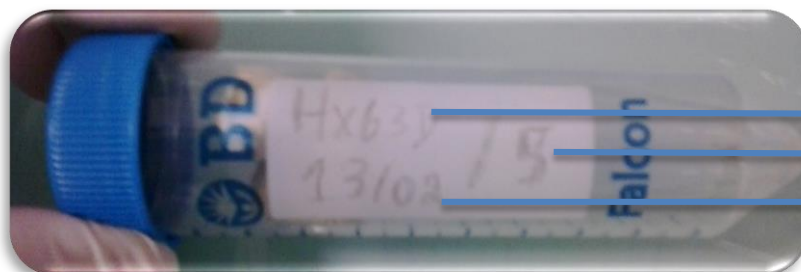


Local do gel refrigerante
Local dos Tubos após recolha
Local dos tubos estéreis
Local dos rolhões

Kit para a recolha de saliva em Ovinos

Método:

1. Identificar os tubos com um lápiz;



Código de exploração
Número da amostra
Data (dia e mês)

2. Com a pinça hemostática (fórceps) agarrar o Cotton rol (3 cotton rol para cada ovelha);

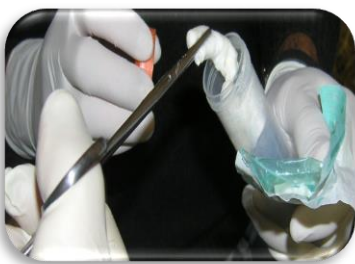


3. Esfregar o Cotton rol na zona do vestíbulo oral entre a arcada alvéolo-dentária inferior, durante aproximadamente 20 a 30 segundos;

Nota: Amostras não devem conter sangue.



4. Após a recolha colocar o Cotton rol no tubo de 50ml previamente etiquetado;



5. Para a adequada conservação das amostras, estas devem ser transportadas em caixa térmica com gelo e depois podem ficar até 48h na arca ou congelador.

Findo este período, devem ser entregues no Laboratório de Anatomia Patológica da ESAV, para serem imediatamente conservados a menos 70°C. Em caso de impossibilidade de se deslocar à ESAV, deve contactar imediatamente:

Professora Helena Vala: hvala@esav.ipv.pt

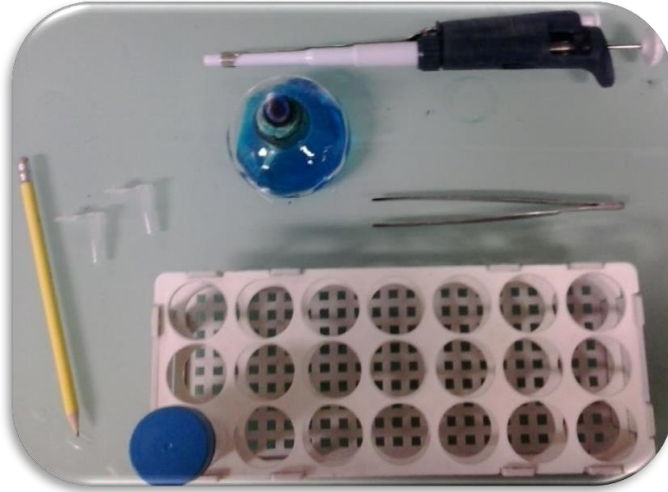
Professor Nuno Rosa: nunorosa33@gmail.com

- E em caso de dúvidas com os procedimentos do protocolo, com a identificação das amostras e tabela contactar: eduardojmesteves@gmail.com ou eduardoesteves@ua.pt.

Anexo 4: Protocolo de armazenamento

Material

Protocolo de armazenamento de amostras



Pipeta P1000; Lamparina; Pinça; Suporte para tubos de 50 ml; Tubos de 0,5 ml; Lápis.

Procedimento

1. Deixar descongelar as amostras;



2. Preencher a tabela com os dados de cada amostra;

1	Numero da amostra	Código da localização	Número inicial	Número final	Data
2					
3					
4					
5					
6					

4. Preparar a centrífuga (3600 rpm; 5 minutos; -4°C e o rotor a 243);



5. Colocar as amostras na centrífuga;



6. Numerar os tubos de 0,5ml correspondente a cada amostra (a lápis na tampa e lateral);



7. Acender a lamparina, passar a pinça na chama e retirar os rolhões;



8. Com a pipeta P1000 pipetar a saliva para os tubos de 0,5ml;



9. Armazenar na arca a -80°C .



Anexo 5: Tabela do repositório biológico de saliva de ovelha Serra da Estrela

Sample Number	Biobank Code	Freguesia	Gender	Age	Pasture (X)	Feed (X)	Hay (X)	Health	Oral Lesions *	Other diseases *	Recent pathologies (Last 3 months)	Collection Date	Storage Date	Number of Replicates (250µl)
1	Ia/1	Esmolfe	F	77 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
2	Ia/2	Esmolfe	F	69 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
3	Ia/3	Esmolfe	F	78 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
4	Ia/4	Esmolfe	F	107 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
5	Ia/5	Esmolfe	F	92 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
6	Ia/6	Esmolfe	F	35 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
7	Ia/7	Esmolfe	F	73 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
8	Ia/8	Esmolfe	F	58 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
9	Ia/9	Esmolfe	F	35 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
10	Ia/10	Esmolfe	F	35 M	X	X	X	X				12/02/14	15/02/14	
1	Ia/11	Esmolfe	F	33 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
2	Ia/12	Esmolfe	F	120 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
3	Ia/13	Esmolfe	F	33 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
4	Ia/14	Esmolfe	F	33 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
5	Ia/15	Esmolfe	F	24 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
6	Ia/16	Esmolfe	F	64 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
7	Ia/17	Esmolfe	F	95 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
8	Ia/18	Esmolfe	F	85 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
9	Ia/19	Esmolfe	F	35 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
10	Ia/20	Esmolfe	F	76 M	X		X	X				12/02/14	15/02/14	
1	Ia/21	Esmolfe	F	95 M	X		X	X			P.Respiratórias	12/02/14	15/02/14	

2	Ia/22	Esmolfe	F	77 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
3	Ia/23	Esmolfe	F	74 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
4	Ia/24	Esmolfe	F	78 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
5	Ia/25	Esmolfe	F	59 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
6	Ia/26	Esmolfe	F	59 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
7	Ia/27	Esmolfe	F	43 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
8	Ia/28	Esmolfe	F	68 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
9	Ia/29	Esmolfe	F	35 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
10	Ia/30	Esmolfe	F	95 M	X		X	X			P.Respir atórias	12/02/14	15/02/14	
1	Ia31	Vila Cova do Covelo	F	43 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
2	Ia32	Vila Cova do Covelo	F	43 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
3	Ia33	Vila Cova do Covelo	F	23 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
4	Ia34	Vila Cova do Covelo	F	75 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
5	Ia35	Vila Cova do Covelo	F	43 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
6	Ia36	Vila Cova do Covelo	F	34 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
7	Ia37	Vila Cova do Covelo	F	76 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
8	Ia38	Vila Cova do Covelo	F	95 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
9	Ia39	Vila Cova do Covelo	F	59 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
10	Ia40	Vila Cova do Covelo	F	107 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	
1	Ia/41	Vila Cova do Covelo	F	23 M	X		X	X			P.Respir atórias	13/02/14	17/02/14	

2	Ia/42	Vila Cova do Covelo	F	34 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
3	Ia/43	Vila Cova do Covelo	F	34 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
4	Ia/44	Vila Cova do Covelo	F	23 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
5	Ia/45	Vila Cova do Covelo	F	34 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
6	Ia/46	Vila Cova do Covelo	F	79 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
7	Ia/47	Vila Cova do Covelo	F	85 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
8	Ia/48	Vila Cova do Covelo	F	107 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
9	Ia/49	Vila Cova do Covelo	F	78 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
10	Ia/50	Vila Cova do Covelo	F	82 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
1	Ia/51	Vila Cova do Covelo	F	82 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
2	Ia/52	Vila Cova do Covelo	F	71 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
3	Ia/53	Vila Cova do Covelo	F	36 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
4	Ia/54	Vila Cova do Covelo	F	68 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
5	Ia/55	Vila Cova do Covelo	F	64 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
6	Ia/56	Vila Cova do Covelo	F	61 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
7	Ia/57	Vila Cova do Covelo	F	78 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
8	Ia/58	Vila Cova do Covelo	F	43 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
9	Ia/59	Vila Cova do Covelo	F	103 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
10	Ia/60	Vila Cova do Covelo	F	71 M	X		X	X				13/02/14	15/02/14	
1	Ia/451	Penaverde	F	12 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	5
2	Ia/452	Penaverde	F	12 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	4
3	Ia/453	Penaverde	F	12 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	4
4	Ia/454	Penaverde	F	28 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	5
5	Ia/455	Penaverde	F	12 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	3
6	Ia/456	Penaverde	F	141 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	2
7	Ia/457	Penaverde	F	28 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	5
8	Ia/458	Penaverde	F	118 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	4
9	Ia/459	Penaverde	F	69 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	4

10	Ia/460	Penaverde	F	91 M	X		X	X				19/03/14	28/04/14	4
1	Ia/71	Real	F	71 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
2	Ia/72	Real	F	23 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
3	Ia/73	Real	F	44 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
4	Ia/74	Real	F	23 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
5	Ia/75	Real	F	44 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
6	Ia/76	Real	F	62 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
7	Ia/77	Real	F	71 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
8	Ia/78	Real	F	84 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
9	Ia/79	Real	F	23 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
10	Ia/80	Real	F	44 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	
1	Ia/81	Real	F	23 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
2	Ia/82	Real	F	44 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
3	Ia/83	Real	F	34 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
4	Ia/84	Real	F	59 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
5	Ia/85	Real	F	59 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
6	Ia/86	Real	F	23 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
7	Ia/87	Real	F	23 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
8	Ia/88	Real	F	84 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
9	Ia/89	Real	F	44 M	X	X	X	X				15/02/14	17/02/14	
10	Ia/90	Real	F	12 M	X	X	X					15/02/14	17/02/14	
1	Ia/91	Real	F	44 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	3
2	Ia/92	Real	F	23 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	2
3	Ia/93	Real	F	121 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	2
4	Ia/94	Real	F	96 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	1
5	Ia/95	Real	F	34 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	3
6	Ia/96	Real	F	44 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	2
7	Ia/97	Real	F	83 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	1
8	Ia/98	Real	F	121 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	1
9	Ia/99	Real	F	34 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	3

10	Ia/100	Real	F	44 M	X		X	X				15/02/14	17/02/14	2
1	Ia/101	Castelo de Penalva	F	43 M	X		X	X				17/02/14	03/03/14	5
2	Ia/102	Castelo de Penalva	F	58 M	X		X	X				17/02/14	03/03/14	3
3	Ia/103	Castelo de Penalva	F	94 M	X		X	X			P.Respir atórias	17/02/14	03/03/14	Falta tubo!!!
4	Ia/104	Castelo de Penalva	F	107 M	X		X	X			P.Respir atórias	17/02/14	03/03/14	5
5	Ia/105	Castelo de Penalva	F	126 M	X		X	X			P.Respir atórias	17/02/14	03/03/14	5
6	Ia/106	Castelo de Penalva	F	58 M	X		X	X			P.Respir atórias	17/02/14	03/03/14	5
7	Ia/107	Castelo de Penalva	F	63 M	X		X	X				17/02/14	03/03/14	5
8	Ia/108	Castelo de Penalva	F	94 M	X		X	X				17/02/14	03/03/14	5
9	Ia/109	Castelo de Penalva	F	63 M	X		X	X				17/02/14	03/03/14	4
10	Ia/110	Castelo de Penalva	F	77 M	X		X	X				17/02/14	03/03/14	4
1	Ia/111	Mareco	M	23 M	X		X	X			P.Respir atórias	19/02/14	03/03/14	
2	Ia/112	Mareco	F	23 M	X		X	X			P.Respir atórias	19/02/14	03/03/14	
3	Ia/113	Mareco	F	23 M	X		X	X			P.Respir atórias	19/02/14	03/03/14	
4	Ia/114	Mareco	F	12 M	X		X	X			P.Respir atórias	19/02/14	03/03/14	
5	Ia/115	Mareco	F	23 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	
6	Ia/116	Mareco	F	73 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	
7	Ia/117	Mareco	F	73 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	
8	Ia/118	Mareco	F	106 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	
9	Ia/119	Mareco	F	33 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	
10	Ia/120	Mareco	F	23 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	
1	Ia/121	Mareco	F	24 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	4
2	Ia/122	Mareco	F	23 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	5
3	Ia/123	Mareco	F	24 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	4
4	Ia/124	Mareco	F	23 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	5
5	Ia/125	Mareco	F	17 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	5

6	Ia/126	Mareco	F	60 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	5
7	Ia/127	Mareco	F	71 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	3
8	Ia/128	Mareco	F	58 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	4
9	Ia/129	Mareco	F	58 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	5
10	Ia/130	Mareco	F	47 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	5
1	Ia/131	Mareco	F	70 M	X		X	X			Respiratory problems	19/02/14	03/03/14	3
2	Ia/132	Mareco	F	24 M	X		X	X			Respiratory problems	19/02/14	03/03/14	5
3	Ia/133	Mareco	F	24 M	X		X	X			Respiratory problems	19/02/14	03/03/14	4
4	Ia/134	Mareco	F	24 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	6
5	Ia/135	Mareco	F	60 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	6
6	Ia/136	Mareco	F	60 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	3
7	Ia/137	Mareco	F	60 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	4
8	Ia/138	Mareco	F	24 M	X		X	X				19/02/14	03/03/14	4
9	Ia/139	Mareco	F	104 M	X		X	X			Respiratory problems	19/02/14	03/03/14	3
10	Ia/140	Mareco	F	24 M	X		X	X			Respiratory problems	19/02/14	03/03/14	3
1	Ia/61	Pindo	F	123 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
2	Ia/62	Pindo	F	104 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
3	Ia/63	Pindo	F	36 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
4	Ia/64	Pindo	F	19 M	X		X	X			P.Respir	13/02/14	15/02/14	

											atórias			
5	Ia/65	Pindo	F	19 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
6	Ia/66	Pindo	F	95 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
7	Ia/67	Pindo	F	19 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
8	Ia/68	Pindo	F	95 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
9	Ia/69	Pindo	F	95 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
10	Ia/70	Pindo	F	27 M	X		X	X			P.Respiratórias	13/02/14	15/02/14	
1	Ia/151	Mareco	M	12 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	3
2	Ia/152	Mareco	F	64 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	4
3	Ia/153	Mareco	F	12 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	4
4	Ia/154	Mareco	F	12 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	2
5	Ia/155	Mareco	M	33 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	3
6	Ia/156	Mareco	F	12 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	3
7	Ia/157	Mareco	F	12 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	3
8	Ia/158	Mareco	F	12 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	2
9	Ia/159	Mareco	F	76 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	6
10	Ia/160	Mareco	F	12 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	4
1	Ia/161	Real	F	108 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	2
2	Ia/162	Real	F	108 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	3
3	Ia/163	Real	F	83 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	3
4	Ia/164	Real	F	22 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	4
5	Ia/165	Real	F	12 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	4
6	Ia/166	Real	F	22 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	3
7	Ia/167	Real	F	60 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	4
8	Ia/168	Real	F	83 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	2
9	Ia/169	Real	F	73 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	7
10	Ia/170	Real	F	95 M	X	X	X	X				19/02/14	24/02/14	2

1	Ia/171	Sezures	F	63 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
2	Ia/172	Sezures	F	23 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
3	Ia/173	Sezures	F	35 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
4	Ia/174	Sezures	F	74 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
5	Ia/175	Sezures	F	12 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
6	Ia/176	Sezures	F	73 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
7	Ia/177	Sezures	F	23 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
8	Ia/178	Sezures	F	35 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
9	Ia/179	Sezures	F	23 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
10	Ia/180	Sezures	F	12 M	X		X	X			P.Respir atórias	24/02/14	03/03/14	
1	Ia/181	Matela	F	67 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
2	Ia/182	Matela	F	93 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
3	Ia/183	Matela	F	67 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
4	Ia/184	Matela	F	22 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
5	Ia/185	Matela	F	42 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
6	Ia/186	Matela	F	42 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	2
7	Ia/187	Matela	F	34 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
8	Ia/188	Matela	F	73 M	X		X	X			P.Respir atórias	27/02/14	03/03/14	3
9	Ia/189	Matela	F	34 M	X		X	X			P.Respir atórias	27/02/14	03/03/14	3
10	Ia/190	Matela	F	73 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
1	Ia/191	Matela	F	88 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
2	Ia/192	Matela	F	119 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
3	Ia/193	Matela	F	22 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
4	Ia/194	Matela	F	48 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4

5	Ia/195	Matela	F	62 M	X		X	X			P.Respir atórias	27/02/14	03/03/14	4
6	Ia/196	Matela	F	79 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
7	Ia/197	Matela	F	22 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	2
8	Ia/198	Matela	F	22 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
9	Ia/199	Matela	F	51 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
10	Ia/200	Matela	F	22 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
1	Ia/201	Matela	F	53 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
2	Ia/202	Matela	F	73 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
3	Ia/203	Matela	F	62 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
4	Ia/204	Matela	F	57 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
5	Ia/205	Matela	F	70 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
6	Ia/206	Matela	F	22 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
7	Ia/207	Matela	F	62 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
8	Ia/208	Matela	F	73 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
9	Ia/209	Matela	F	93 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
10	Ia/210	Matela	F	70 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
1	Ia/211	Matela	F	42 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
2	Ia/212	Matela	F	34 M	X		X	X			P.Respir atórias	27/02/14	03/03/14	3
3	Ia/213	Matela	F	34 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
4	Ia/214	Matela	F	120 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
5	Ia/215	Matela	F	22 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
6	Ia/216	Matela	F	128 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
7	Ia/217	Matela	F	141 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
8	Ia/218	Matela	F	34 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	3
9	Ia/219	Matela	F	67 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
10	Ia/220	Matela	F	22 M	X		X	X				27/02/14	03/03/14	4
1	Ia/221	Penaverde	F	16 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
2	Ia/222	Penaverde	F	90 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
3	Ia/223	Penaverde	F	126 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	

4	Ia/224	Penaverde	F	16 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
5	Ia/225	Penaverde	F	16 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
6	Ia/226	Penaverde	F	120 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
7	Ia/227	Penaverde	F	16 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
8	Ia/228	Penaverde	F	116 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
9	Ia/229	Penaverde	F	16 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
10	Ia/230	Penaverde	F	77 M	X		X	X				10/03/14	17/03/14	
1	Ia/231	Ínsua	F	60 M	X		X	X				01/03/14	17/03/14	2
2	Ia/232	Ínsua	F	60 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	4
3	Ia/233	Ínsua	F	108 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	6
4	Ia/234	Ínsua	F	60 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	2
5	Ia/235	Ínsua	F	95 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	6
6	Ia/236	Ínsua	F	120 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	6
7	Ia/237	Ínsua	F	72 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	5
8	Ia/238	Ínsua	F	62 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	5
9	Ia/239	Ínsua	F	42 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	3
10	Ia/240	Ínsua	F	23 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	5
1	Ia/241	Germil	F	55 M	X		X	X				01/03/14	17/03/14	3
2	Ia/242	Germil	F	22 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	2
3	Ia/243	Germil	F	66 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	2
4	Ia/244	Germil	F	22 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	5
5	Ia/245	Germil	F	73 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	4
6	Ia/246	Germil	F	41 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	5
7	Ia/247	Germil	F	66 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	5
8	Ia/248	Germil	F	118 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	5
9	Ia/249	Germil	F	93 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	2
10	Ia/250	Germil	F	55 M	X		X	X				01/03/14	10/03/14	6
1	Ia/251	Sezures	F	132 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
2	Ia/252	Sezures	F	62 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
3	Ia/253	Sezures	F	12 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	2

4	Ia/254	Sezures	F	121 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
5	Ia/255	Sezures	F	24 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
6	Ia/256	Sezures	F	12 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	9
7	Ia/257	Sezures	F	24 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	6
8	Ia/258	Sezures	F	35 M	X		X	X		Partiu-se		03/03/14		
9	Ia/259	Sezures	F	60 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	3
10	Ia/260	Sezures	F	24 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
1	Ia/261	Germil	M	22 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
2	Ia/262	Germil	F	75 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	3
3	Ia/263	Germil	F	22 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
4	Ia/264	Germil	F	66 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	2
5	Ia/265	Germil	F	66 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
6	Ia/266	Germil	F	75 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	3
7	Ia/267	Germil	F	22 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
8	Ia/268	Germil	F	66 M	X		X	X		Partiu na centrifuga		03/03/14		
9	Ia/269	Germil	F	66 M	X		X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	3
10	Ia/270	Germil	F	35 M	X		X	X				03/03/14	17/03/14	5
1	Ia/271	Forninhos	F	12 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	5
2	Ia/272	Forninhos	F	75 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	3
3	Ia/273	Forninhos	M	40 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	2
4	Ia/274	Forninhos	F	24 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	5
5	Ia/275	Forninhos	F	116 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	4
6	Ia/276	Forninhos	F	92 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	5
7	Ia/277	Forninhos	F	114 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	4
8	Ia/278	Forninhos	F	12 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	3

9	Ia/279	Forninhos	F	38 M	X	X	X	X			P.Respir atórias	03/03/14	17/03/14	3
10	Ia/280	Forninhos	F	76 M	X	X	X	X	Não trazia amostra!					
1	Ia/281	Carapito	F	12 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	5
2	Ia/282	Carapito	F	12 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	5
3	Ia/283	Carapito	F	12 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	5
4	Ia/284	Carapito	F	12 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	5
5	Ia/285	Carapito	F	83 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	3
6	Ia/286	Carapito	F	61 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	5
7	Ia/287	Carapito	F	69 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	6
8	Ia/288	Carapito	F	18 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	6
9	Ia/289	Carapito	F	18 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	3
10	Ia/290	Carapito	F	105 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	3
1	Ia/291	Dornelas	F	62 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	5
2	Ia/292	Dornelas	F	52 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
3	Ia/293	Dornelas	F	92 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
4	Ia/294	Dornelas	F	62 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
5	Ia/295	Dornelas	F	33 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
6	Ia/296	Dornelas	F	67 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	5
7	Ia/297	Dornelas	F	52 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
8	Ia/298	Dornelas	F	67 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
9	Ia/299	Dornelas	F	67 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
10	Ia/300	Dornelas	F	69 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
1	Ia/301	Dornelas	F	52 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	5
2	Ia/302	Dornelas	F	16 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
3	Ia/303	Dornelas	F	67 M	X		X	X			P.Respir atórias	08/03/14	18/03/14	5
4	Ia/304	Dornelas	F	16 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
5	Ia/305	Dornelas	F	45 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
6	Ia/306	Dornelas	F	16 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3
7	Ia/307	Dornelas	M	67 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	3

8	Ia/308	Dornelas	F	45 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
9	Ia/309	Dornelas	F	52 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
10	Ia/310	Dornelas	F	16 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	6
1	Ia/311	Penaverde	F	108 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	5
2	Ia/312	Penaverde	F	90 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	5
3	Ia/313	Penaverde	F	24 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
4	Ia/314	Penaverde	F	15 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
5	Ia/315	Penaverde	F	69 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	6
6	Ia/316	Penaverde	F	24 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
7	Ia/317	Penaverde	F	51 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	4
8	Ia/318	Penaverde	F	102 M	X		X	X			P.Respir atórias	08/03/14	18/03/14	3
9	Ia/319	Penaverde	F	78 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	6
10	Ia/320	Penaverde	F	15 M	X		X	X				08/03/14	18/03/14	5
1	Ia/321	Eirado	F	55 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	4
2	Ia/322	Eirado	F	17 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	5
3	Ia/323	Eirado	F	17 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	6
4	Ia/324	Eirado	F	17 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	6
5	Ia/325	Eirado	F	55 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	7
6	Ia/326	Eirado	F	40 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	5
7	Ia/327	Eirado	F	17 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	3
8	Ia/328	Eirado	F	40 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	5
9	Ia/329	Eirado	F	55 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	4
10	Ia/330	Eirado	F	17 M	X		X	X				10/03/14	18/03/14	3
1	Ia/331	Penaverde	F	40 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	3
2	Ia/332	Penaverde	F	17 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	3
3	Ia/333	Penaverde	F	17 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	3
4	Ia/334	Penaverde	F	40 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	4
5	Ia/335	Penaverde	F	17 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	6
6	Ia/336	Penaverde	F	75 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	3

7	Ia/337	Penaverde	F	41 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	5
8	Ia/338	Penaverde	M	18 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	4
9	Ia/339	Penaverde	F	18 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	2
10	Ia/340	Penaverde	F	69 M	X	X	X	X				17/03/14	02/04/14	5
1	Ia/341	Penaverde	F	76 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	6
2	Ia/342	Penaverde	F	44 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
3	Ia/343	Penaverde	F	52 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	7
4	Ia/344	Penaverde	F	90 M	X		X	X			P.Respiratórias	17/03/14	02/04/14	5
5	Ia/345	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	6
6	Ia/346	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
7	Ia/347	Penaverde	F	72 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	3
8	Ia/348	Penaverde	F	36 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
9	Ia/349	Penaverde	F	68 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
10	Ia/350	Penaverde	F	72 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	7
1	Ia/351	Penaverde	F	34 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	6
2	Ia/352	Penaverde	F	38 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
3	Ia/353	Penaverde	F	50 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	6
4	Ia/354	Penaverde	F	15 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
5	Ia/355	Penaverde	M	15 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	6
6	Ia/356	Penaverde	F	90 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	6
7	Ia/357	Penaverde	F	72 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
8	Ia/358	Penaverde	M	22 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	3
9	Ia/359	Penaverde	F	15 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
10	Ia/360	Penaverde	F	54 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	7
1	Ia/361	Penaverde	M	12 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
2	Ia/362	Penaverde	F	50 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
3	Ia/363	Penaverde	F	38 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
4	Ia/364	Penaverde	F	75 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	2

5	Ia/365	Penaverde	F	50 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
6	Ia/366	Penaverde	F	68 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
7	Ia/367	Penaverde	F	68 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	2
8	Ia/368	Penaverde	F	15 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
9	Ia/369	Penaverde	F	38 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	7
10	Ia/370	Penaverde	F	38 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	6
1	Ia/371	Penaverde	F	61 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
2	Ia/372	Penaverde	F	46 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	6
3	Ia/373	Penaverde	F	48 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
4	Ia/374	Penaverde	F	48 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
5	Ia/375	Penaverde	F	48 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
6	Ia/376	Penaverde	F	47 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	3
7	Ia/377	Penaverde	M	17 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
8	Ia/378	Penaverde	F	48 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	4
9	Ia/379	Penaverde	F	34 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
10	Ia/380	Penaverde	F	75 M	X		X	X				17/03/14	02/04/14	5
1	Ia/381	Penaverde	F	79 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	5
2	Ia/382	Penaverde	F	17 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	4
3	Ia/383	Penaverde	F	12 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	5
4	Ia/384	Penaverde	F	17 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	6
5	Ia/385	Penaverde	F	12 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	7
6	Ia/386	Penaverde	F	63 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	3
7	Ia/387	Penaverde	F	63 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	2
8	Ia/388	Penaverde	F	52 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	4
9	Ia/389	Penaverde	F	79 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	4
10	Ia/390	Penaverde	F	37 M	X		X	X				21/03/14	02/04/14	6
1	Ia/391	Penaverde	F	72 M	X		X	X		Frifa		17/03/14	03/04/14	4
2	Ia/392	Penaverde	F	87 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	1

3	Ia/393	Penaverde	F	72 M	X		X	X	Absesso			17/03/14	03/04/14	4
4	Ia/394	Penaverde	F	72 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	4
5	Ia/395	Penaverde	F	90 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3
6	Ia/396	Penaverde	F	15 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	1
7	Ia/397	Penaverde	F	24 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3
8	Ia/398	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	1
9	Ia/399	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	2
10	Ia/400	Penaverde	F	69 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3
1	Ia/401	Penaverde	F	18 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	2
2	Ia/402	Penaverde	F	15 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	4
3	Ia/403	Penaverde	F	18 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	2
4	Ia/404	Penaverde	F	108 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	2
5	Ia/405	Penaverde	F	58 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	3
6	Ia/406	Penaverde	F	18 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	2
7	Ia/407	Penaverde	F	46 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	3
8	Ia/408	Penaverde	F	15 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	3
9	Ia/409	Penaverde	F	15 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	4
10	Ia/410	Penaverde	F	18 M	X		X	X				20/03/14	03/04/14	3
1	Ia/411	Penaverde	F	49 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	5
2	Ia/412	Penaverde	F	28 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	4
3	Ia/413	Penaverde	F	72 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3
4	Ia/414	Penaverde	F	17 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	4
5	Ia/415	Penaverde	F	43 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	4
6	Ia/416	Penaverde	F	56 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3
7	Ia/417	Penaverde	F	28 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3
8	Ia/418	Penaverde	F	17 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3
9	Ia/419	Penaverde	F	17 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3
10	Ia/420	Penaverde	F	17 M	X		X	X				17/03/14	03/04/14	3

1	Ia/421	Cortiçada	F	60 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
2	Ia/422	Cortiçada	F	60 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
3	Ia/423	Cortiçada	F	20 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
4	Ia/424	Cortiçada	F	34 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
5	Ia/425	Cortiçada	F	12 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
6	Ia/426	Cortiçada	F	87 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
7	Ia/427	Cortiçada	F	87 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	5
8	Ia/428	Cortiçada	F	34 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
9	Ia/429	Cortiçada	F	94 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	4
10	Ia/430	Cortiçada	F	60 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	4
1	Ia/431	Penaverde	F	75 M	X		X	X				19/03/14	03/04/14	4
2	Ia/432	Penaverde	F	56 M	X		X	X				19/03/14	03/04/14	6
3	Ia/433	Penaverde	F	115 M	X		X	X				19/03/14	03/04/14	5
4	Ia/434	Penaverde	F	44 M	X		X	X				19/03/14	03/04/14	5
5	Ia/435	Penaverde	F	122 M	X		X	X			P.Respiratórias	19/03/14	03/04/14	4
6	Ia/436	Penaverde	F	75 M	X		X	X			P.Respiratórias	19/03/14	03/04/14	4
7	Ia/437	Penaverde	F	75 M	X		X	X				19/03/14	03/04/14	3
8	Ia/438	Penaverde	F	44 M	X		X	X			P.Respiratórias	19/03/14	03/04/14	4
9	Ia/439	Penaverde	F	44 M	X		X	X				19/03/14	03/04/14	6
10	Ia/440	Penaverde	F	50 M	X		X	X				19/03/14	03/04/14	5
1	Ia/441	Cortiçada	F	120 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	3
2	Ia/442	Cortiçada	F	20 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
3	Ia/443	Cortiçada	F	40 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	6
4	Ia/444	Cortiçada	F	93 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	5
5	Ia/445	Cortiçada	F	53 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	5
6	Ia/446	Cortiçada	F	53 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	4
7	Ia/447	Cortiçada	F	58 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	7

8	Ia/448	Cortiçada	F	20 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	3
9	Ia/449	Cortiçada	F	75 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	7
10	Ia/450	Cortiçada	F	40 M	X		X	X				22/03/14	03/04/14	2
1	Ia/561	Lusinde	F	38 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	2
2	Ia/562	Lusinde	F	24 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	3
3	Ia/563	Lusinde	F	44 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	4
4	Ia/564	Lusinde	F	25 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	3
5	Ia/565	Lusinde	F	38 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	6
6	Ia/566	Lusinde	F	44 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	4
7	Ia/567	Lusinde	F	64 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	1
8	Ia/568	Lusinde	F	25 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	3
9	Ia/569	Lusinde	F	64 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	2
10	Ia/570	Lusinde	F	44 M	X		X	X				09/04/14	29/04/14	3
1	Ia/461	Penaverde	M	77 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
2	Ia/462	Penaverde	F	39 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	2
3	Ia/463	Penaverde	F	78 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	3
4	Ia/464	Penaverde	F	68 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
5	Ia/465	Penaverde	F	127 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
6	Ia/466	Penaverde	F	68 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	7
7	Ia/467	Penaverde	F	90 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
8	Ia/468	Penaverde	F	78 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	2
9	Ia/469	Penaverde	F	78 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
10	Ia/470	Penaverde	F	78 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	3
1	Ia/471	Penaverde	F	18 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
2	Ia/472	Penaverde	F	62 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	3
3	Ia/473	Penaverde	F	67 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
4	Ia/474	Penaverde	F	67 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
5	Ia/475	Penaverde	F	45 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	2

6	Ia/476	Penaverde	F	67 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
7	Ia/477	Penaverde	F	79 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
8	Ia/478	Penaverde	F	62 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
9	Ia/479	Penaverde	F	45 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
10	Ia/480	Penaverde	F	77 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	2
1	Ia/481	Cortiçada	F	80 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	6
2	Ia/482	Cortiçada	F	93 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	3
3	Ia/483	Cortiçada	F	67 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	5
4	Ia/484	Cortiçada	F	46 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	4
5	Ia/485	Cortiçada	F	67 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	3
6	Ia/486	Cortiçada	F	67 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	3
7	Ia/487	Cortiçada	F	46 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	4
8	Ia/488	Cortiçada	F	46 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	4
9	Ia/489	Cortiçada	F	131 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	2
10	Ia/490	Cortiçada	F	20 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	4
1	Ia/491	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
2	Ia/492	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	2
3	Ia/493	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	3
4	Ia/494	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
5	Ia/495	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
6	Ia/496	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	7
7	Ia/497	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	3
8	Ia/498	Penaverde	M	17 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	7
9	Ia/499	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
10	Ia/500	Penaverde	F	12 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
1	Ia/501	Penaverde	F	78 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
2	Ia/502	Penaverde	F	32 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
3	Ia/503	Penaverde	F	59 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5

4	Ia/504	Penaverde	F	74 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
5	Ia/505	Penaverde	F	71 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
6	Ia/506	Penaverde	F	32 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
7	Ia/507	Penaverde	F	95 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
8	Ia/508	Penaverde	F	32 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
9	Ia/509	Penaverde	F	17 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
10	Ia/510	Penaverde	F	32 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
1	Ia/511	Cortiçada	F	87 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	5
2	Ia/512	Cortiçada	F	116 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	2
3	Ia/513	Cortiçada	F	12 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	6
4	Ia/514	Cortiçada	F	67 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	5
5	Ia/515	Cortiçada	F	12 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	4
6	Ia/516	Cortiçada	F	12 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	5
7	Ia/517	Cortiçada	F	12 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	6
8	Ia/518	Cortiçada	F	67 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	Amostra estragada
9	Ia/519	Cortiçada	F	12 M	X		X	X				22/03/14	28/04/14	5
10	Ia/520	Amostra estragada		Amostra estragada								Amostra estragada		
1	Ia/521	Penaverde	F	109 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
2	Ia/522	Penaverde	M	24 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
3	Ia/523	Penaverde	F	19 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
4	Ia/524	Penaverde	F	50 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
5	Ia/525	Penaverde	F	45 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
6	Ia/526	Penaverde	F	19 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
7	Ia/527	Penaverde	F	50 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	3
8	Ia/528	Penaverde	F	45 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	3
9	Ia/529	Penaverde	F	19 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
10	Ia/530	Penaverde	F	19 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5

1	Ia/531	Penaverde	F	72 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
2	Ia/532	Penaverde	F	24 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
3	Ia/533	Penaverde	F	77 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
4	Ia/534	Penaverde	F	77 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	4
5	Ia/535	Penaverde	F	91 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
6	Ia/536	Penaverde	F	24 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	3
7	Ia/537	Penaverde	F	24 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	7
8	Ia/538	Penaverde	F	90 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
9	Ia/539	Penaverde	F	24 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	6
10	Ia/540	Penaverde	F	90 M	X		X	X				17/03/14	28/04/14	5
1	Ia/541	Eirado	F	88 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	4
2	Ia/542	Eirado	F	28 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	4
3	Ia/543	Eirado	F	16 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	5
4	Ia/544	Eirado	F	16 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	6
5	Ia/545	Eirado	F	62 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	4
6	Ia/546	Eirado	F	28 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	7
7	Ia/547	Eirado	F	16 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	4
8	Ia/548	Eirado	F	40 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	3
9	Ia/549	Eirado	F	16 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	3
10	Ia/550	Eirado	F	69 M	X		X	X				10/03/14	29/04/14	3
1	Ia/551	Penaverde	F	90 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	6
2	Ia/552	Penaverde	F	44 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	6
3	Ia/553	Penaverde	F	90 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	3
4	Ia/554	Penaverde	M	15 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	7
5	Ia/555	Penaverde	F	115 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	3
6	Ia/556	Penaverde	F	85 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	6
7	Ia/557	Penaverde	F	60 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	5
8	Ia/558	Penaverde	F	56 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	7

9	Ia/559	Penaverde	F	90 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	5
10	Ia/560	Penaverde	F	27 M	X		X	X				08/03/14	29/04/14	4
1	Ia/141	Mareco	F	23 M	X		X	X				19/02/14	24/02/14	3
2	Ia/142	Mareco	F	118M	X		X	X				19/02/14	24/02/14	2
3	Ia/143	Mareco	F	42 M	X		X	X			Digestiv e + Respirat ory Problem s	19/02/14	24/02/14	3
4	Ia/144	Mareco	F	64 M	X		X	X			Digestiv e Problem s	19/02/14	24/02/14	2
5	Ia/145	Mareco	F	73 M	X		X	X			Digestiv e Problem s	19/02/14	24/02/14	Não tinha tubo
6	Ia/146	Mareco	F	61 M	X		X	X			Digestiv e Problem s	19/02/14	24/02/14	2
7	Ia/147	Mareco	F	73 M	X		X	X			Digestiv e Problem s	19/02/14	24/02/14	4
8	Ia/148	Mareco	F	1036 M	X		X	X				19/02/14	24/02/14	2
9	Ia/149	Mareco	F	34 M	X		X	X				19/02/14	24/02/14	3
10	Ia/150	Mareco	F	44 M	X		X	X			Digestiv e + Respirat ory Problem s	19/02/14	24/02/14	4
1	Ia/571	Valverde	F	58 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	4
2	Ia/572	Valverde	F	90 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	3
3	Ia/573	Valverde	F	115 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	6

4	Ia/574	Valverde	F	90 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	4
5	Ia/575	Valverde	F	115 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	2
6	Ia/576	Valverde	F	53 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	4
7	Ia/577	Valverde	F	24 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	5
8	Ia/578	Valverde	F	60 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	3
9	Ia/579	Valverde	F	53 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	
10	Ia/580	Valverde	F	90 M	X		X	X				19/03/14	29/04/14	

Anexo 6: Tabela funcional

Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;		Fasciolosis;	
Proteins involved in diseases																					
UniprotKBAC		Name		P08060		W5PZ11		G3LUQ4		P67976		P02669		E7BQS8		E4WMCO		P68240		P12303	
Serum albumin		Carbonic anhydrase		alpha-1-acid glycoprotein		alpha-1-antitrypsin		alpha-2-macroglobulin		beta-2-microglobulin		beta-2-microglobulin		beta-2-microglobulin		beta-2-microglobulin		beta-2-microglobulin		beta-2-microglobulin	
GoSlim	Ontology	lipoprotein metabolic process																			
		metabolic process																			
		proteolysis																			
		DNA catabolic process																			
		apoptotic process																			
		cell death																			
		cellular nitrogen compound metabolic process																			
		nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis																			
		DNA catabolic process																			
		endonucleolytic																			
		cellular iron ion homeostasis																			
		negative regulation of catalytic activity																			
		negative regulation of endopeptidase activity																			
		negative regulation of peptidase activity																			
		defense response																			
		defense response to bacterium																			
		one-carbon metabolic process																			
		iron ion transport																			
		lactation																			
		lipid transport																			
		oxygen transport																			
		transport																			
		vitamin transport																			
		lipid transport																			
		oxygen transport																			
		transport																			
		vitamin transport																			
		lipid transport																			
		oxygen transport																			
		transport																			
		vitamin transport																			

Anexo 7: Mastitis e saúde

Código UniProt	Protein names	Tipo de amostra	Regulação	Raça
P62262	14-3-3 protein epsilon (14-3-3E) (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1)	mammary tissue	-1,54	Sarda sheep
Q6Q311	40S ribosomal protein S25	mammary tissue	-3,55	Sarda sheep
W5PFW3	40S ribosomal protein S4	mammary tissue	-2,76	Sarda sheep
P00349	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)	milk	-1.83	
W5PQR5	60S ribosomal protein L18	milk	1.80	
W5P2M4	60S ribosomal protein L27 (Fragment)	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5P3J0	60S ribosomal protein L6	mammary tissue	-2,11	Sarda sheep
Q28559	Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) (EC 6.4.1.2) (ACC-alpha) [Includes: Biotin carboxylase (EC 6.3.4.14)]	mammary tissue	-5,71	Sarda sheep
P60713	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed]	mammary tissue	1,69	Sarda sheep
W5QAX3	Actin, cytoplasmic 1 (Fragment)	milk	2.64	
C5IWU0	ADP-ribosylation factor 1 (Uncharacterized protein)	mammary tissue	-1,78	Sarda sheep
C5IWT0	ADP-ribosylation factor 4 (Uncharacterized protein)	milk	-0.93	
C5IWU1	ADP-ribosylation factor 6 (Uncharacterized protein)	mammary tissue	-1,97	Sarda sheep
P04653	Alpha-S1-casein	milk	0.63	
E4WMC1	Alpha-S2-casein (Fragment)	milk	-0.83	
E7BQS8	Alpha-s2-casein (Fragment)	milk	-0.83	
W5PZM9	Annexin	milk	1.57	
W5QBI9	Annexin	milk	3.30	
W5PJM4	Annexin	milk	2.03	
W5PSZ5	Annexin	milk	2.91	
W5PJM5	Annexin (Fragment)	milk	2.03	

K4P221	Annexin (Fragment)	milk	1.57	
W5QEU6	Annexin (Fragment)	milk	-2.81	
A2SW69	Annexin A2 (Annexin-2)	milk	-0.03	
W5NY50	ATP synthase subunit alpha	milk	5.27	
Q009B1	ATP-binding cassette sub-family G member 2 (Breast cancer resistance protein) (Uncharacterized protein)	milk	-5.19	
P11839	Beta-casein	milk	2.16	
W5PLC2	Beta-casein	milk	2.16	
P67976	Beta-lactoglobulin-1/B (Beta-LG)	milk	-0.94	
B1A8Z2	Calcium and integrin-binding protein 1 (Calmyrin)	mammary tissue	-2.27	Sarda sheep
W5PQE9	Calcium-transporting ATPase (EC 3.6.3.8)	mammary tissue	-4.67	Sarda sheep
B2ZA85	Calpain 1 80 kDa subunit (EC 3.4.22.52)	milk	1.83	
P54230	Cathelicidin-1 (Bactenecin-1) (Bac1) (Cyclic dodecapeptide)	milk	3.17	
P50415	Cathelicidin-3 (Bactenecin-7) (Bac7) (PR-59)	mammary tissue	1.67	Sarda sheep
A2TJJ2	CD11b	milk	5.11	
W5PMF3	Claudin	mammary tissue	-2.10	Sarda sheep
W5PZI1	Clusterin	milk	-3.22	
Q5G2C3	Coatomer protein complex subunit gamma 2 (Fragment)	mammary tissue	-2.71	Sarda sheep
Q5G2C4	Coatomer protein complex subunit gamma 2 (Fragment)	mammary tissue	-2.71	Sarda sheep
Q6B7M7	Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform)	milk	1.58	
W5Q9P7	Cofilin-1 (Fragment)	milk	1.58	
Q9XT28	Copper transport protein ATOX1 (Copper chaperone SAH) (Metal transport protein ATX1)	mammary tissue	-1.89	Sarda sheep
Q9MYX6	DNA binding protein pur-alpha	mammary tissue	-1.89	Sarda sheep
W5PEC5	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 (EC 2.4.99.18)	milk	2.65	
Q717R8	Elongation factor 1-delta (EF-1-delta)	mammary	-1.73	Sarda

		tissue		sheep
E9K9T6	Fatty acid synthase (Fragment)	mammary tissue	-2,99	Sarda sheep
C5IJ88	GDI2	mammary tissue	-2,01	Sarda sheep
D7R7V6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	mammary tissue	2,73	Sarda sheep
W5PDG3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	milk	4.62	
Q28554	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-) (Fragment)	milk	4.62	
S4TZR5	Guanine nucleotide-binding protein beta polypeptide 2-like 1 (Uncharacterized protein)	mammary tissue	-2,76	Sarda sheep
B7P027	H+ transporting ATP synthase subunit D	milk	2.21	
A7VJC2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1)	mammary tissue	2,45	Sarda sheep
W5Q6F0	Histone H2A	mammary tissue	1,85	Sarda sheep
W5QFN5	Histone H2A	mammary tissue	2,20	Sarda sheep
W5PZ59	Histone H2A	milk	3.00	
W5PHK5	Histone H2A	milk	2.41	
W5QA51	Histone H2B	milk	-0.09	
W5NS71	Histone H2B	milk	1.61	
W5Q9Y2	Histone H2B	milk	1.61	
W5NR06	Histone H2B	milk	1.61	
W5QA24	Histone H2B	milk	1.61	
W5NRX3	Histone H2B	milk	1.61	
W5QAH2	Histone H2B	milk	1.61	
W5NR98	Histone H2B	milk	1.61	
W5QGB5	Histone H4	milk	-0.69	
W5PHM4	Histone H4 (Fragment)	mammary tissue	1,59	Sarda sheep

W5QFN7	Histone H4 (Fragment)	mammary tissue	1,59	Sarda sheep
W5QFN8	Histone H4 (Fragment)	mammary tissue	1,59	Sarda sheep
W5QFP4	Histone H4 (Fragment)	milk	-0.69	
W5QFN3	Histone H4 (Fragment)	milk	-0.69	
W5PHH3	Histone H4 (Fragment)	milk	-0.69	
W5PHL0	Histone H4 (Fragment)	milk	-0.69	
W5QFR6	Histone H4 (Fragment)	milk	-0.69	
W5QFQ2	Histone H4 (Fragment)	milk	-0.69	
W5QCD6	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42)	milk	-1.54	
Q6XUZ5	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic (IDH) (EC 1.1.1.42) (Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase) (IDP) (NADP(+)-specific ICDH) (Oxalosuccinate decarboxylase)	milk	-1.54	
P02669	Kappa-casein	milk	0.64	
W5PIN4	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)	mammary tissue	3,51	Sarda sheep
W5Q646	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) (Fragment)	mammary tissue	3,05	Sarda sheep
R9QXS6	Lactoferrin	milk	1.65	
D3G9G3	Lactoferrin	milk	1.65	
Q5MJE8	Lactoferrin	milk	1.65	
W5PAG0	Lysine-tRNA ligase (EC 6.1.1.6) (Lysyl-tRNA synthetase)	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5QFQ0	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	mammary tissue	-2,35	Sarda sheep
W5QFQ1	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Fragment)	mammary tissue	-2,35	Sarda sheep
W5PL47	Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.-) (Fragment)	mammary tissue	-2,43	Sarda sheep
G5CC04	Milk fat globule EGF factor 8 protein (Fragment)	milk	-2.91	
P79360	Myeloid antimicrobial peptide (Uncharacterized protein)	milk	4.68	
Q30DQ9	Neutrophil cytosolic factor (Fragment)	milk	2.21	

K4P1S5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	mammary tissue	-2,26	Sarda sheep
W5QHU9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	milk	2,52	
A6ZE99	Perilipin	milk	-2,89	
W5P5K7	Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8)	mammary tissue	-2,44	Sarda sheep
C6JUQ0	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	milk	-0,81	
W5PMM7	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) (Fragment)	milk	-0,81	
W5NQH6	Protein S100 (S100 calcium-binding protein)	milk	3,80	
W5QIV1	Protein S100 (S100 calcium-binding protein) (Fragment)	milk	3,08	
P82197	Pyridoxal kinase (EC 2.7.1.35) (Pyridoxine kinase)	mammary tissue	-2,34	Sarda sheep
C5IJ83	RAB8A (Uncharacterized protein)	milk	-0,66	
B2LYK6	RAS oncogene family-like 7A (Uncharacterized protein)	milk	0,99	
C5IJ89	RHEB	mammary tissue	-3,69	Sarda sheep
C5IJ99	RHOA (Uncharacterized protein)	mammary tissue	-2,00	Sarda sheep
B2ZHC0	RhoB	mammary tissue	-2,55	Sarda sheep
B2MVW5	RhoF	mammary tissue	-3,81	Sarda sheep
B0FZM0	Ribosomal protein L14-like protein (Fragment)	mammary tissue	-2,03	Sarda sheep
W5P374	Ribosomal protein L15 (Fragment)	milk	0,45	
B7U168	SLC25A3	milk	2,99	
P53791	Sodium/glucose cotransporter 1 (Na ⁺)/glucose cotransporter 1) (High affinity sodium-glucose cotransporter) (Solute carrier family 5 member 1)	mammary tissue	-4,21	Sarda sheep
C7BDV7	SRI	mammary tissue	2,72	Sarda sheep
W5NPI2	Sulfotransferase (EC 2.8.2.-) (Fragment)	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
C8BKD6	Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	milk	-0,40	
W5QH64	Synaptosomal-associated protein	mammary	-4,03	Sarda

		tissue		sheep
W5QFZ3	T-complex protein 1 subunit delta (Fragment)	mammary tissue	-2,71	Sarda sheep
W5P765	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment)	milk	1.29	
J9UP74	Taste receptor type 2 (Fragment)	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5Q5G8	Transketolase (EC 2.2.1.1)	milk	1.01	
D0VWZ0	Tubulin alpha chain	mammary tissue	1,65	Sarda sheep
D0VWY9	Tubulin beta chain	milk	3.86	
W5PMA6	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5QBQ9	Uncharacterized protein	mammary tissue	4,88	Sarda sheep
W5PFP1	Uncharacterized protein	mammary tissue	3,85	Sarda sheep
W5Q9W2	Uncharacterized protein	milk	-0.09	
W5PSW9	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,54	Sarda sheep
W5Q6N3	Uncharacterized protein	milk	-0.60	
W5NTA0	Uncharacterized protein	mammary tissue	1,82	Sarda sheep
W5PPT6	Uncharacterized protein	mammary tissue	1,92	Sarda sheep
W5NZJ3	Uncharacterized protein	mammary tissue	2,12	Sarda sheep
W5QGJ0	Uncharacterized protein	milk	-0.40	
W5PMY9	Uncharacterized protein	mammary tissue	2,95	Sarda sheep
W5PSB5	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5PTW5	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,11	Sarda sheep
W5Q4E1	Uncharacterized protein	milk	1.36	
W5QFK5	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,76	Sarda sheep

W5P7A1	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,31	Sarda sheep
W5QFP2	Uncharacterized protein	mammary tissue	2,65	Sarda sheep
W5PMC5	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,94	Sarda sheep
W5PNM6	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,91	Sarda sheep
W5NUE1	Uncharacterized protein	mammary tissue	2,45	Sarda sheep
W5P645	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,59	Sarda sheep
W5PQH0	Uncharacterized protein	milk	-2.09	
W5P9M3	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,72	Sarda sheep
W5P4Z8	Uncharacterized protein	milk	-0.69	
W5QIW7	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,26	Sarda sheep
W5PMQ4	Uncharacterized protein	milk	-0.49	
W5NS51	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5QHX9	Uncharacterized protein	mammary tissue	2,02	Sarda sheep
W5NYA8	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5PZC7	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,05	Sarda sheep
W5P4S2	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5Q4K1	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,90	Sarda sheep
W5NQ34	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,34	Sarda sheep
W5P684	Uncharacterized protein	mammary tissue	1,60	Sarda sheep
W5Q7N4	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5P409	Uncharacterized protein	milk	3.90	

W5P1G5	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,83	Sarda sheep
W5NUK4	Uncharacterized protein	milk	2.21	
W5QEJ5	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,91	Sarda sheep
W5QHN1	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5Q9A9	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5PTA0	Uncharacterized protein	milk	1.58	
W5Q8A7	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,95	Sarda sheep
W5P4C0	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,96	Sarda sheep
W5PZT4	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,90	Sarda sheep
W5PDZ6	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5QCB7	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5PUH4	Uncharacterized protein	milk	0.08	
W5Q4S3	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5PXU2	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,64	Sarda sheep
W5P561	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,68	Sarda sheep
W5PV71	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5QER2	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,13	Sarda sheep
W5PU19	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,34	Sarda sheep
W5NS57	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,84	Sarda sheep
W5Q3E3	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,14	Sarda sheep
W5PP18	Uncharacterized protein	mammary	-1,89	Sarda

		tissue		sheep
W5PF02	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,05	Sarda sheep
W5Q5R5	Uncharacterized protein	milk	2,65	
W5NTE8	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,58	Sarda sheep
W5NS59	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,44	Sarda sheep
W5PS49	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,43	Sarda sheep
W5PFU1	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5P929	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5Q0M7	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,95	Sarda sheep
W5P458	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5Q7Q6	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5PJG7	Uncharacterized protein	milk	0,74	
W5PLB7	Uncharacterized protein	milk	2,65	
W5PE01	Uncharacterized protein	milk	0,08	
W5NUV1	Uncharacterized protein	milk	-1,14	
W5NRD1	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,27	Sarda sheep
W5NQL3	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,58	Sarda sheep
W5PMT0	Uncharacterized protein	milk	-3,59	
W5Q1V1	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5NU00	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5QEY8	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,48	Sarda sheep
W5P114	Uncharacterized protein	mammary	-3,62	Sarda

		tissue		sheep
W5PMU4	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,24	Sarda sheep
W5P0V6	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,47	Sarda sheep
W5QHL5	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5PUU0	Uncharacterized protein	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5PM94	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,40	Sarda sheep
W5NU39	Uncharacterized protein	mammary tissue	-4,22	Sarda sheep
W5PN84	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,51	Sarda sheep
W5Q8J3	Uncharacterized protein	mammary tissue	-4,26	Sarda sheep
W5P5B2	Uncharacterized protein	milk	1,29	
W5QCV4	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,12	Sarda sheep
W5PHW0	Uncharacterized protein	milk	2,16	
W5QB95	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,66	Sarda sheep
W5NTJ6	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,83	Sarda sheep
W5PJX0	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,43	Sarda sheep
W5QBQ8	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,11	Sarda sheep
W5PQV5	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,28	Sarda sheep
W5QEL8	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,23	Sarda sheep
W5PPH6	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,65	Sarda sheep
W5P5S1	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,83	Sarda sheep
W5Q3W4	Uncharacterized protein	milk	-0,45	

W5NUN8	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,46	Sarda sheep
W5QGX7	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,74	Sarda sheep
W5NWP4	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,71	Sarda sheep
W5NPT7	Uncharacterized protein	milk	-2.70	
W5NYZ5	Uncharacterized protein	milk	2.03	
W5PIY0	Uncharacterized protein	milk	2.37	
W5QHD8	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,94	Sarda sheep
W5P3K5	Uncharacterized protein	milk	2.03	
W5PUU2	Uncharacterized protein	mammary tissue	-2,84	Sarda sheep
W5QJ50	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,05	Sarda sheep
W5PUK3	Uncharacterized protein	mammary tissue	-3,98	Sarda sheep
W5P601	Uncharacterized protein	milk	-0.35	
W5NRI1	Uncharacterized protein	milk	0.63	
W5NUU9	Uncharacterized protein	milk	-1.14	
W5PZ94	Uncharacterized protein	mammary tissue	-4,69	Sarda sheep
W5P6P2	Uncharacterized protein	milk	0.16	
W5NSD5	Uncharacterized protein	milk	2.04	
W5P7Q3	Uncharacterized protein	milk	2.99	
W5Q2D9	Uncharacterized protein	milk	-0.47	
W5NUH1	Uncharacterized protein	milk	-1.14	
W5NXM4	Uncharacterized protein	milk	1.27	
W5QDG8	Uncharacterized protein	mammary tissue	-4,39	Sarda sheep
W5P2U6	Uncharacterized protein	milk	-0.69	

W5QHP3	Uncharacterized protein	milk	0.74	
W5PCL4	Uncharacterized protein	milk	-3.31	
W5QGI2	Uncharacterized protein	milk	-0.40	
W5NUE3	Uncharacterized protein	milk	-2.59	
W5P6P4	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,37	Sarda sheep
W5P5T8	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	0.45	
W5P363	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,68	Sarda sheep
W5NQL2	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,44	Sarda sheep
W5QGA4	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,14	Sarda sheep
W5NPK5	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	0.63	
W5PDQ0	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	1,73	Sarda sheep
W5Q354	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5PR48	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5Q1R8	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,80	Sarda sheep
W5QIA8	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5NV76	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,20	Sarda sheep
W5PYG8	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,11	Sarda sheep
W5PLV3	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,20	Sarda sheep
W5Q8J9	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,76	Sarda sheep
W5PDZ5	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,84	Sarda sheep
W5Q7Z7	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,70	Sarda sheep

W5PU40	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,46	Sarda sheep
W5NQK9	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	1,86	Sarda sheep
W5NSB2	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,89	Sarda sheep
W5PMV0	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,24	Sarda sheep
W5P1X5	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5PF71	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,59	Sarda sheep
W5Q575	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,79	Sarda sheep
W5PUJ4	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5NW17	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,44	Sarda sheep
W5Q831	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,10	Sarda sheep
W5QCI3	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,78	Sarda sheep
W5P633	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-1,65	Sarda sheep
W5NUS5	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	3.17	
W5Q438	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	-2.11	
W5PZ65	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,11	Sarda sheep
W5P0V5	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	1.29	
W5NRB0	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,32	Sarda sheep
W5QGX9	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,45	Sarda sheep
W5PV56	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,24	Sarda sheep
W5P381	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,23	Sarda sheep
W5PUR8	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary	-2,10	Sarda

		tissue		sheep
W5PBW1	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	-2.67	
W5Q3N1	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	0.93	
W5PN31	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,46	Sarda sheep
W5PPT8	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,28	Sarda sheep
W5P2Q6	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,69	Sarda sheep
W5Q7R8	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-2,93	Sarda sheep
W5PMU9	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,24	Sarda sheep
W5PBP1	Uncharacterized protein (Fragment)	mammary tissue	-3,14	Sarda sheep
W5Q532	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	-1.00	
W5QFH5	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	1.29	
W5PNM3	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	0.81	
W5PTR5	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	1.19	
W5PY10	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	2.09	
W5PBM0	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	0.93	
W5PU75	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	-0.93	
W5PMX7	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	-1.76	
W5PSC1	Uncharacterized protein (Fragment)	milk	1.53	