

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

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO
PLASMA SEMINAL EQUINO E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE
DO SÊMEN

CRISTINA RODRIGUES TREIN

PORTO ALEGRE
2011

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

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO
PLASMA SEMINAL EQUINO E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE
DO SÊMEN

CRISTINA RODRIGUES TREIN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Veterinária da
UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em
Medicina Animal
Orientadora: MARIA INÊS MASCARENHAS JOBIM

PORTO ALEGRE
2011

CIP - Catalogação na Publicação

CRISTINA RODRIGUES, TREIN
ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE
POLIACRILAMIDA DO PLASMA SEMINAL EQUINO E SUA
RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN / TREIN
CRISTINA RODRIGUES. -- 2011.
118 f.

Orientadora: JOBIM MARIA INÊS MASCARENHAS.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL. 2. PLASMA SEMINAL.
3. PROTEÍNAS. 4. CONGELABILIDADE DO SÊMEN. 5.
EQUINO. I. MARIA INÊS MASCARENHAS, JOBIM, orient.
II. Título.

CRISTINA RODRIGUES TREIN

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO
PLASMA SEMINAL EQUINO E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE
DO SÊMEN

Aprovado em 17 de outubro de 2011.

APROVADA POR:

Prof. Dr. Maria Inês Mascarenhas Jobim
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Membro da Comissão

Prof. Dr. Christianne Salbego
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim, pela confiança depositada, pela orientação e pelo apoio incansável para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos pelo suporte fundamental à realização deste trabalho e por todos os anos de orientação e oportunidades desde a iniciação científica no REPROLAB – UFRGS.

Ao Prof. Dr. Eduardo Malschitzky, pela paciência e disposição para a execução do experimento, no acompanhamento das eletroforeses.

A minha irmã, Bióloga Márcia Rodrigues Trein pelo apoio de grande valia na execução do experimento.

A Dra. Caroline Wolf pela companhia e pelo auxílio despendido na reta final.

A todos os professores e estagiários que, de alguma forma participaram do desenvolvimento do trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela minha formação e pela estrutura fornecida para a execução do projeto.

Ao CNPq/PRONEX/FAPERGS por financiar esta pesquisa.

Ao Haras Estatal da Baixa Saxônia, Celle, Alemanha, pelo fornecimento das amostras de plasma seminal.

Ao Enio Brito, esposo e veterinário, pelo acompanhamento e ajuda incondicionais em todas as fases desta jornada.

A Marina, por existir na minha vida.

RESUMO

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO PLASMA SEMINAL EQUINO E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN

Tese de Doutorado

Autor: Cristina Rodrigues Trein

Orientadora: Maria Inês Mascarenhas Jobim

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil proteico do plasma seminal equino utilizando eletroforese bidimensional de gel de acrilamida (2D-PAGE) e determinar se algumas das proteínas presentes estavam relacionadas com a congelabilidade do sêmen. O plasma seminal foi coletado de dez garanhões, de alta e baixa congelabilidade de sêmen, provenientes do Haras Estatal da Baixa Saxônia, na cidade de Celle, na Alemanha e rotineiramente utilizados em programas de inseminação artificial. Vinte e cinco bandas proteicas foram encontradas nos géis bidimensionais (12%) e sete delas foram identificadas por MALDI-MS. Das 25 proteínas encontradas nas amostras de plasma seminal dos garanhões, duas bandas proteicas apresentaram densidade óptica superior ($P < 0,05$) nas amostras de garanhões de alta congelabilidade o sêmen: as bandas 5 (80-85 kDa, pI 7,54), que foi identificada como CRISP3 e a 45 (18,2 kDa, pI 5,0-5,2) identificada como HSP-2. Contrariamente a banda 7 (75,4 kDa, pI 6,9 – 7,4), identificada como lactoferrina, a 15 (26,7 kDa, pI 5,51) identificada como calicreína, a 25 (25 kDa, pI 7,54) como CRISP3 e a 35 (13,9 kDa, pI 3,8 – 4,2) que foi identificada como HSP-1, apresentaram valores de densidade óptica superior ($P < 0,05$) nos reprodutores de baixa congelabilidade do sêmen. As proteínas foram identificadas através de espectometria de massa MALDI-MS. As evidências encontradas neste experimento mostram que existem diferenças no perfil proteico dos reprodutores de alta e baixa congelabilidade do sêmen, sugerindo as proteínas CRISP3 e a HSP-2 como possíveis marcadores da alta congelabilidade de sêmen de garanhões.

Palavras-chave: CRISP3, HSP-1, HSP-2, lactoferrina, calicreína, eletroforese bidimensional

ABSTRACT
TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OF
EQUINE SEMINAL PLASMA PROTEINS AND THEIR RELATION WITH
SEMEN FREEZABILITY

Thesis

Author: Cristina Rodrigues Trein

Adviser: Maria Inês Mascarenhas Jobim

The objective of this study was to evaluate protein profile of equine seminal plasma using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and to find if any of these proteins were related to semen freezability. Seminal plasma was collected from 10 stallions of high and low semen freezability routinely used in AI programs from the State Stud of Lower Saxony and Artificial Insemination Center. Twenty five protein spots were identified from the 2 D gel (12%), seven of which were present in all samples. Of the 25 proteins found in the research stallions, two spots showed superior relative content ($P < 0.05$) in seminal plasma samples collected from stallions with high semen freezability: the spots 5 (80-85 kDa, pI 7.54) was identified as CRISP3 and 45 (18.2 kDa, pI 5.0-5.2) was identified as HSP-2. Conversely, the spot 7 (75.4 kDa, pI 6.9 – 7.4) was identified as lactoferrin, 15 (26.7 kDa, pI 5.51) was identified as kallikrein, 25 (25 kDa, pI 7.54) was identified as CRISP3 and 35 (13.9 kDa, pI 3.8 – 4.2) was identified as HSP-1, showed superior relative protein content ($P < 0.05$) on seminal plasma samples from stallions with low semen freezability. The proteins were identified by MALDI-MS. There were differences in the seminal plasma protein profile between stallions with high and low semen freezability. It may be suggested that CRISP3 and HSP-2 may be considered possible seminal plasma markers of high semen freezability.

Key-words: CRISP3, HSP-1, HSP-2, lactoferrin, kallikrein, two-dimensional electrophoresis

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Figura 1. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida das proteínas do plasma seminal equino. Gel bidimensional com 12% SDS-PAGE corado com Coomassie blue. A seta superior mostra a direção do gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE) da terminação alcalina (+) para a ácida (–) na primeira dimensão. A seta na esquerda demonstra a direção do peso molecular. A seta indica as proteínas no plasma seminal equino que apresentaram diferença na congelabilidade do sêmen..... **52**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais proteínas do plasma seminal de diferentes espécies.....	17
TABELA 2	Média e desvio padrão da densidade óptica dos polipeptídios do plasma seminal equino que apresentaram diferença quanto à congelabilidade do sêmen.....	50
TABELA 3	Peso molecular, ponto isoelétrico e média e desvio padrão da densidade óptica dos polipeptídios do plasma seminal dos 10 garanhões.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	O Espermatozoide.....	12
2.2	O Plasma Seminal.....	14
2.2.1	Glândulas Acessórias.....	15
2.3	Proteínas do Plasma Seminal.....	16
2.3.1	Proteínas Ricas em Cisteína (CRISP).....	17
2.3.2	Proteínas que Contém o Domínio Fibronectina Tipo II (Fn-II).....	19
2.3.3	Proteínas da Família das Espermedesinas.....	21
2.3.4	Outras Proteínas do Plasma Seminal.....	22
2.3.5	Proteínas do Plasma Seminal Relacionadas a Congelabilidade do Sêmen.....	23
2.4	A Eletroforese Bidimensional.....	24
2.5	A Espectrometria de Massa.....	26
2.6	A Criopreservação do Sêmen.....	28
2.6.1	Crioprotetores.....	30
3	ARTIGO: Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida do plasma seminal equino e sua relação com a congelabilidade do sêmen.....	34
4	CONCLUSÕES.....	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
	APÊNDICE A – Espectrograma e Sequenciamento da Lactoferrina (Banda 7).....	76
	APÊNDICE B – Espectrograma e Sequenciamento da Calicreína (Banda 15).....	84
	APÊNDICE C – Espectrograma e Sequenciamento da CRISP-3 (Bandas 5 e 25)....	89
	APÊNDICE D – Espectrograma e Sequenciamento da HSP1(Banda 35).....	98
	APÊNDICE E - Espectrograma e Sequenciamento da HSP2 (Banda 45).....	103
	APÊNDICE F – Imagem do gel de poliacrilamida a 12% após eletroforese bidimensional, gerada no programa de análise de imagem Optiquant.....	109
	APÊNDICE G – Artigo publicado no periódico Theriogenology.....	110

1 INTRODUÇÃO

Os negócios que envolvem a criação e utilização do cavalo ocupam uma posição de destaque nos países desenvolvidos e em muitos daqueles em desenvolvimento, como o Brasil (CEPEA, 2006).

O Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil possui uma importância social e econômica traduzida por uma movimentação financeira da ordem de R\$ 7,3 bilhões por ano e a ocupação direta de cerca de 640 mil pessoas, cifra que poderia atingir a casa de 3,2 milhões se os empregos considerados indiretos forem incluídos (CEPEA, 2006).

Sabe-se que uma das ferramentas responsáveis pelo incremento da criação nacional é o melhoramento genético, sendo que a biotecnologia da reprodução em equinos, através da maximização do aproveitamento do potencial genético de animais de alto padrão, é uma área que vem conquistando cada vez mais espaço dentro da equinocultura nacional e mundial.

Atualmente, técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial, transferência de embriões, criopreservação de gametas e embriões, fertilização *in vitro*, transferência intrafalopiana de gametas e inseminação intracitoplasmática tem impulsionado pesquisas com o objetivo de aperfeiçoar a aplicabilidade de tais técnicas e incrementar os índices obtidos a campo.

Relata-se que em equinos, a primeira congelação de sêmen bem sucedida ocorreu em 1950. No entanto, somente em 1957 que Barker e Gandier relataram a primeira concepção decorrente de inseminação com sêmen congelado.

Dentre as várias vantagens no uso de sêmen congelado destacam-se: éguas e potros não precisam ser transportados até os garanhões; a ansiedade em relação à logística do sêmen e problemas associados com o sêmen refrigerado são eliminados; os garanhões podem participar de eventos durante a estação de coberturas; doenças, lesões ou óbitos não impedem a continuação do uso do sêmen dos animais para reprodução; utilização em maior escala do sêmen de reprodutores geneticamente superiores; possibilidade de distribuição internacional; formação de um banco genético e disponibilidade deste por tempo indeterminado (SAMPER & HANKINS, 2001; LOOMIS, 2001; LOOMIS & SQUIRES, 2005).

Entre as desvantagens, destaca-se a grande variabilidade individual na qualidade do sêmen pós-descongelação entre os garanhões e as de taxas de prenhez inferiores,

quando comparado à monta natural e inseminação com sêmen refrigerado (SAMPER & HANKINS, 2001; LOOMIS, 2001).

Apesar dos progressos realizados nos últimos anos no processo da criopreservação, a eficiência desta biotecnologia segue sendo insuficiente para ser aplicada de forma rotineira na indústria equina. As lesões espermáticas, como consequência implícita da aplicação da tecnologia do congelamento levam a alterações na viabilidade, integridade de membrana, estado acrossomal e da motilidade dos espermatozoides (MAXWELL et al., 1997; MAXWELL & JOHNSON, 1999), além disso, também ocorre o aparecimento de uma subpopulação de espermatozoides em um estado de capacitação ou pré-capacitação que culmina em exocitose prematura do conteúdo acrossomal, provocando uma diminuição da capacidade fecundante dos espermatozoides processados (MAXWELL & JOHNSON, 1997; CENTURIÓN et al., 2003; PARRILLA et al., 2004). Entre os fatores que ocasionam esta situação está incluída a perda de substâncias protetoras procedentes do plasma seminal que cobrem a membrana plasmática do espermatozoide (MAXWELL & JOHNSON, 1997; PARRILLA et al., 2004).

A adição de certa quantidade de plasma seminal aos diluentes utilizados no processo de criopreservação tem sido base de diversos estudos, cujo objetivo foi minimizar os danos espermáticos na aplicação desta biotecnologia (MAXWELL & JOHNSON, 1999). Sem dúvida, o efeito da adição de plasma seminal aos espermatozoides nas diferentes espécies domésticas é controvertido, apresentando efeitos tanto positivos quanto negativos na função espermática, na fertilidade ou na congelabilidade do sêmen. Alguns autores observaram um efeito prejudicial sobre a sobrevivência espermática de algumas frações do plasma seminal, como a fração prostática de cães (ENGLAND & ALLEN, 1992), a fração gelatinosa em equinos e suínos (MANN & LUTWAK-MANN, 1981) ou a secreção das vesículas seminais no bode (AZERÊDO et al., 2000). Uma possível explicação para a variabilidade encontrada nos efeitos do plasma seminal poderia ser a presença ou ausência de determinados componentes do plasma seminal, assim como a variação existente na concentração dos mesmos, mais provavelmente no caso de componentes proteicos (FOURNIER-DELPECH & THIBAUT, 1993).

Diversos estudos demonstraram uma relação entre certas proteínas do plasma seminal do touro e índices de fertilidade apresentados por estes animais (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1994; MOURA et al., 2006; MOURA et al., 2007; MOURA et

al., 2010), bem como algumas proteínas do plasma seminal foram relacionadas com a congelabilidade do sêmen bovino (RONCOLETTA et al., 2000; JOBIM, 2001; JOBIM et al., 2004; BERGERON et al., 2007; MANJUNATH et al., 2007), ovino (BARRIOS et al., 2000; REBOLLEDO et al., 2007), bubalino (HIRON et al., 2006; ASADPOUR et al., 2007) e do suíno (CASAS et al., 2009).

Também foram observadas diferenças nos efeitos do plasma seminal sobre os espermatozoides dependendo da fonte de plasma seminal: machos de alta ou baixa fertilidade (HENAULT & KILLIAN, 1996; AURICH et al., 1996) ou machos com alta ou baixa motilidade pós-descongelção (VIDAMENT, 2005).

Entretanto, os estudos das proteínas do plasma seminal equino e sua relação com a congelabilidade do sêmen são ainda limitados e o perfil proteico do plasma seminal equino ainda não foi relacionado à congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional.

Assim, a pesquisa relatada nesta tese teve como objetivos:

1. Avaliar o perfil proteico do plasma seminal de garanhões de alta e baixa congelabilidade do sêmen, utilizados em Programas de Inseminação Artificial, através de eletroforese bidimensional;
2. Relacionar o perfil proteico do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de garanhões doadores;
3. Identificar as proteínas de relevância para a congelabilidade do sêmen, caracterizadas nesta pesquisa, pelo sequenciamento através de espectrometria de massa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Espermatozoide

As principais características morfológicas do espermatozoide foram conhecidas no início do século XX. Nessa época, a fisiologia e a bioquímica do sêmen avançaram significativamente, mas vários anos ainda transcorreram para a evidência de que as funções mais importantes do espermatozoide, como a motilidade e a capacidade de fertilização, fossem associadas às diferentes estruturas da célula espermática: cabeça, cauda ou flagelo e membrana plasmática.

A cabeça do espermatozoide contém o núcleo, com uma estrutura de dupla parede, o acrossoma, situado entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. Dentro do núcleo, existe cromatina condensada, DNA e a protamina, principal proteína associada ao DNA espermático. A cabeça do espermatozoide equino mede $6,62 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de comprimento por $3,26 \pm 0,19 \mu\text{m}$ de largura e tem uma área de $16,28 \pm 0,80 \mu\text{m}^2$. A porção anterior do núcleo é envolta pelo acrossoma, uma vesícula especializada, formada por uma dupla membrana, que é constituído dos segmentos apical, principal e equatorial (REFERENCIA).

Durante a reação acrossômica, a membrana externa do acrossoma e a membrana plasmática fundem-se e são formadas vesículas; através dos espaços formados, ocorre a exocitose do conteúdo acrossomal (EDDY, 1988). O segmento equatorial não contém enzimas; conseqüentemente, não está envolvido com a reação acrossômica, mas a membrana plasmática funde-se com a membrana do oócito nesta área (AMMAN & GRAHAM, 1992).

O acrossoma contém glicolipídeos e enzimas, como a fosfolipase A (ALLISSON & HARTREE, 1970), pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas, envolvidas no processo da fertilização (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). A membrana acrossomal externa é composta por sete glicoproteínas (290, 280, 260, 115, 81, 58 e 46 kDa) e mais outras proteínas com 34 e 12 kDa. Foi sugerido que moléculas glicosiladas neste sítio pudessem ajudar a estabilizar a membrana ou possuir um papel funcional nos eventos de fusão na reação acrossomal. As três proteínas com peso molecular em torno de 200 kDa e a de 58 kDa são fosforiladas, enquanto que as proteínas de 34 e 12 kDa parecem incluir proteínas de ligação à calmodulina (OLSSON, 1985).

O flagelo ou cauda do espermatozoide mamífero é formado de quatro segmentos distintos: o colo, a peça intermediária, a peça principal e a peça final (EDDY, 1988). As principais estruturas do flagelo são o axonema ou filamento axial, a bainha de mitocôndrias e a bainha fibrosa externa. O filamento axial é composto de dois microtúbulos centrais, circundados por nove microtúbulos duplos, que se estendem por todo o flagelo. Os microtúbulos são compostos das proteínas α e β tubulina, de 56 e 54,5 kDa, respectivamente e de outra proteína, a dineína, que possui atividade ATPase (EDDY, 1988) e que provê energia química para o mecanismo da movimentação espermática (AMANN & GRAHAM, 1992). A peça intermediária é envolvida pela bainha de mitocôndrias, tendo a forma de espiral dupla, enquanto a peça principal contém a bainha fibrosa (EDDY, 1988). A bainha mitocondrial contém enzimas e cofatores necessários para a produção de ATP (AMANN & GRAHAM, 1992). A peça terminal, posterior à membrana fibrosa, contém somente o axonema, recoberto pela membrana plasmática (GARNER & HAFEZ, 1995).

O espermatozoide é recoberto pela membrana plasmática, uma dupla camada com porções hidrofílicas de lipídios e de proteínas; complexas interações entre eles regulam os receptores de membrana, os íons ou as enzimas e a função celular (HAMMERSTEDT et al., 1990). Esta membrana plasmática está subdividida em regiões específicas, que diferem em sua composição e função. Moléculas envolvidas na reação acrossômica estão presentes na região anterior do acrossoma (SAILLING, 1986); moléculas envolvidas na fusão oócito-espermatozoide são encontradas na região posterior do acrossoma (SAILLING et al., 1985) e moléculas envolvidas com a atividade flagelar estão associadas com a membrana plasmática do flagelo (KOPF et al., 1986).

A composição da membrana plasmática é modificada assim que o espermatozoide deixa o testículo. Alterações na superfície espermática ocorrem durante a maturação no epidídimo e durante a exposição aos produtos das glândulas acessórias na ejaculação; a superfície espermática também é alterada no trato reprodutivo da fêmea. Durante a capacitação, alguns componentes da superfície espermática são perdidos e outros migram para fora de seus domínios. Essas mudanças na composição e organização dos componentes da superfície da membrana espermática indicam que os componentes da membrana plasmática são porções dinâmicas da célula (EDDY, 1988).

2.2 O Plasma Seminal

O plasma seminal, fluido no qual os espermatozoides estão suspensos na ejaculação, fornece o meio de sobrevivência e transporte espermático; seu volume e composição variam muito entre as espécies (MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

O plasma seminal é um fluido complexo onde encontramos grandes quantidades de água, íons inorgânicos, ácido cítrico, açúcares, sais orgânicos, prostaglandinas e um número variado de proteínas, que servirão de tampão mantendo uma osmolaridade e pH adequados, além de proporcionar fontes de energia para o metabolismo espermático, tanto aeróbico como anaeróbico (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). E sem dúvida, são as proteínas secretadas, as que contribuem de forma mais relevante na regulação da maior parte das funções espermáticas, sendo objeto de numerosos estudos.

O contato dos espermatozoides com as distintas substâncias que compõem o plasma seminal ocorre de forma sequencial. Os espermatozoides passam através do epidídimo, onde vão adquirir sua capacidade fecundante e motilidade. Este trânsito terá uma duração variável, dependendo da espécie, desde os 5,5 dias na espécie humana, 7,5-11 dias no equino, até os 16 dias no ovino (FRANÇA et al., 2005). No epidídimo a glicerilfosforilcolina, a carnitina e o ácido siálico são encontrados em altas concentrações; são também elevadas as taxas sódio/potássio, os principais cátions no plasma seminal dos mamíferos (MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

Conforme o espermatozoide entra no epidídimo, a membrana plasmática sofrerá uma grande remodelação, tanto na composição proteica e fosfolipídica, como de localização dos diferentes domínios do espermatozoide. Enquanto que a maior parte das proteínas testiculares será eliminada ou sofrerá degradação através de diversas enzimas proteolíticas, como ocorre com os diferentes membros da família Adams (BLOBEL, 2000), a hialorunidase (pH20/2B1) (SEATON et al., 2000) e a forma germinal da enzima conversora da angiotensina (GATTI et al., 1999), um grande número de novas proteínas secretadas pelo epidídimo (principalmente na região da cabeça e corpo) serão integradas na membrana espermática durante seu trânsito epididimário (GATTI et al., 2004; DACHEUX et al., 2005).

2.2.1 Glândulas Acessórias

Após a ejaculação, os espermatozoides procedentes do epidídimo entram em contato com as distintas secreções procedentes das glândulas vesiculares, próstata e bulbouretrais. O conjunto de substâncias produzidas por estas glândulas é espécie específico e altamente variável entre indivíduos da mesma espécie, assim como entre ejaculados de um mesmo indivíduo, podendo ainda variar com a estação do ano ou estado fisiológico do animal (PÉREZ-PÉ et al., 2001; CARDOZO et al., 2006). Variações na composição do plasma seminal de diferentes machos têm sido relacionadas com diferentes índices de fertilidade (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1994; BELLIN et al., 1996; BRANDON et al., 1999; KOISTINEN et al., 2000; MOURA et al., 2006) e congelabilidade (RONCOLETTA et al., 2000; BARRIOS et al., 2000; JOBIM, 2001; JOBIM et al., 2004; HIRON et al., 2006; BERGERON et al., 2007; MANJUNATH et al., 2007; REBOLLEDO et al., 2007; ASADPOUR et al., 2007; CASAS et al., 2009). Em um experimento, os espermatozoides provenientes de touros de alta e baixa fertilidade foram submetidos à lavagem e logo após, expostos ao plasma seminal de touro de fertilidade contrastante. Foi verificada a penetração em oócito bovino livre de zona pelúcida e observado que os espermatozoides lavados e expostos ao plasma seminal de touros de alta fertilidade penetravam mais oócitos que aqueles espermatozoides expostos ao plasma seminal de touros de baixa fertilidade. Entretanto, a penetração por espermatozoides de alta fertilidade era diminuída quando expostos ao plasma seminal de touros de baixa fertilidade. O plasma seminal de touros de baixa fertilidade pode conter fatores de antifertilidade, com um efeito mais negativo nos espermatozoides de alta do que nos de baixa fertilidade (HENAULT & KILLIAN, 1996).

Outro aspecto influenciado pela variabilidade na composição do plasma seminal é a motilidade espermática. Foi observado que a adição de plasma seminal heterólogo pode afetar positiva ou negativamente esta característica, dependendo da fonte de plasma seminal (AURICH et al., 1996; KNEUPPEL et al., 2000; SCHMITT, 2002; TREIN, 2004).

Além das variações entre indivíduos e entre ejaculados, foram demonstradas variações entre frações de plasma seminal equino em um mesmo ejaculado (AURICH et al., 1998; KATILA et al., 2004; AKCAY et al. 2006;). Zhu et al. (2000) observaram uma melhor taxa de penetração *in vitro* em espermatozoides incubados com plasma

seminal proveniente da fração rica do ejaculado. E ainda, foram encontradas diferenças na capacidade de sobrevivência espermática ao processo de criopreservação, de acordo com a fração do ejaculado a que pertencessem (SIEME et al., 2004; KARESKOSKI et al., 2006). Foi sugerido que estas variações poderiam estar relacionadas a diferenças no perfil proteico das distintas frações do ejaculado (PEÑA et al., 2006).

As glândulas acessórias são as responsáveis pela produção da maior parte do volume do ejaculado. Entre os compostos secretados, encontram-se uma série de componentes minerais como o zinco (Zn^{2+}), com propriedades de estabilização de macromoléculas e antibacteriana (STRZEZEK et al., 1987), o íon cálcio (Ca^{2+}), que participa dos fenômenos de capacitação espermática e reação acrossomal, os açúcares, como a frutose e o inositol, o ácido cítrico e o ácido ascórbico, que proporcionam energia para o metabolismo celular (VOGLMAYR & AMANN, 1973; FREI et al., 1990), aminoácidos (ácido glutâmico, carnitina, taurina, hipotaurina), que servem de fonte de energia e de proteção contra espécies reativas de oxigênio e enzimas (proteases, acrosina, nucleases, fosfatase ácida e alcalina e superóxido dismutase), que intervêm na liquefação seminal, penetração no oócito pelo espermatozoide, digestão de espermatozoides mortos e danificados e proteção contra espécies reativas de oxigênio (HARRISON, 1975; ZINI et al., 1993).

2.3 Proteínas do Plasma Seminal

Conforme mencionado, os componentes do plasma seminal que influem de forma mais importante na fertilidade e função espermática são as proteínas, das quais encontramos três famílias principais: proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISPs), proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II (Fn-II), proteínas da família das espermadesinas. As principais proteínas do plasma seminal de diferentes espécies encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais proteínas do plasma seminal de diferentes espécies.

Família ou classe Proteica	Espécie	Proteínas	Referência
CRISPs	Humano	CRISP1, CRISP2, CRISP3	Udby et al., 2005
	Equino	CRISP1, CRISP2, CRISP3 (HSP3)	Schambony et al., 1998b Töpfer-Petersen et al., 2005
	Rato	CRISP1	Da Ros et al., 2004
Proteínas com domínio fibronectina tipo II (Fn-II).	Equino	HSP-1, HSP-2, EQ-12	Calvete et al., 1995b Töpfer-Petersen et al., 2005 Saalman et al., 2001
	Bovino	BSP-A1/A2, (PDC-109), BSP-30kDa	Manjunath & Sairam, 1987 Manjunath e Therien, 2002
	Ovino	RSVP-14, RSVP-20, RSP-15, RSP-22, RSP-24	Barrios et al., 2005 Bergeron et al., 2005
	Caprino	GSP-14, GSP-15, GSP-20, GSP-22 kDa	Villemure et al., 2003
	Suíno	pB1	Calvete et al., 1997 ^a
	Bisonte	BISV-16, BISV-17, BISV-18, BISV-28 kDa	Boisvert et al., 2004
Espermadesinas	Equino	HSP-7	Reinert et al., 1996
	Bovino	aSFP, Z13	Wempe et al., 1992 Tedeschi et al., 2000
	Ovino	Espermadesina de 15,5 kDa	Bergeron et al., 2005
	Suíno	AWN, AQN-1, AQN-3, PSPI/PSP-II	Calvete et al., 1995c Varela et al., 1997

Adaptado de Posadas, I. C. (2007)

2.3.1 Proteínas Ricas em Cisteína (CRISPs)

Os membros da família de proteínas CRISPs (CRISP1, CRISP2, CRISP3) caracterizam-se pela presença de 16 resíduos de cisteína, ligados por pontes dissulfeto, subdividindo a molécula em três domínios (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Estas três proteínas foram identificadas no trato genital de equinos, humanos e roedores. Nas várias espécies, a expressão gênica da família CRISP ocorre sob o controle androgênico (CAMEO & BLAQUIER, 1976; JALKANEN et al., 2005).

A função dos diversos membros da família CRISP na reprodução parece estar relacionada com processos de espermiogênese, maturação do espermatozoide, capacitação espermática e na interação espermatozoide-oócito (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

O papel das proteínas CRISP na fertilização foi bem estudado no rato. A CRISP1 (inicialmente denominada proteína DE) torna-se fortemente associada à superfície espermática durante o trânsito epididimário e migra para o segmento equatorial durante a capacitação (DA ROS et al., 2004). Ela participa da fusão espermatozoide-oócito através dos sítios de ligação da proteína a sítios complementares na superfície do oócito (CUASNICU et al., 2001), entretanto, não participa nos eventos da ativação do oócito (BUSSO et al., 2003). A análise da função estrutural indicou que os padrões corretos das pontes dissulfíto com a molécula é crucial para a realização desta função (ELLERMAN et al., 2002).

A CRISP2 (TPX1) está envolvida na adesão específica das células da espermatogênese às células de Sertoli (MAEDA et al., 1999).

A CRISP3 (HSP3) apresenta a particularidade de liberação da membrana plasmática (ao menos parcialmente) através de lavado das células espermáticas e por isto foi sugerido que poderia possuir alguma função no trato genital da fêmea (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

As proteínas CRISPs no espermatozoide equino localizam-se na cabeça, em suas regiões equatorial e pós-acrossomal, bem como na peça intermediária. Sua associação com a superfície espermática tem início na região do corpo do epidídimo (SCHAMBONY et al., 1998b). As CRISPs permanecem localizadas nos mesmos compartimentos espermáticos após a capacitação *in vitro* e a reação acrossômica (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

As proteínas CRISPs (especialmente a CRISP3) podem ser removidas da célula espermática através de lavagem com altas concentrações de sal. Entretanto, algumas moléculas da CRISP permanecem fortemente ligadas à superfície espermática (SCHAMBONY et al., 1998b). Este número de moléculas da CRISP mostrou-se diretamente correlacionadas à fertilidade individual de garanhões (REINEKE et al., 1999).

A CRISP3 (HSP-3) é a principal proteína do plasma seminal equino (SCHAMBONY et al., 1998a) e seu gene é predominantemente expresso nas ampolas do canal deferente, contribuindo assim para a alta concentração desta proteína

(1mg/mL) no plasma desta espécie. Quantidades superiores de CRISP3 foram positivamente relacionadas com a taxa de concepção no primeiro ciclo por Novak, et al. (2010) e poderia ser considerado um bom marcador de fertilidade no equino. O gene da CRISP1 (AEG1) é expresso em todo epidídimo (GIESE et al., 2002a), enquanto que a CRISP2 (TPX1), testículo-específica, é expressa não só no testículo, mas também no epidídimo e vesículas seminais (GIESE et al., 2002b). O padrão de expressão do gene da CRISP foi acompanhado através do estudo do nível proteico, no qual estas proteínas foram detectadas com diferentes pesos moleculares (em torno de 25 kDa), no trato genital do equino (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Os diferentes padrões de expressão dos genes das CRISPs, em garanhões de diferentes fertilidades podem sugerir a explicação para o papel essencial destas proteínas na reprodução equina (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Foi sugerido que a CRISP1 e/ou moléculas da CRISP2 podem influenciar diretamente os eventos da fertilização (fusão espermatozoide–oócito), enquanto que a CRISP3 pode contribuir na função do plasma seminal no trato genital da fêmea. Entretanto o preciso papel das proteínas CRISP na fertilização do equino ainda necessita de maiores investigações (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

2.3.2 Proteínas que Contém o Domínio Fibronectina Tipo II (Fn-II).

A família de proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II (Fn-II), são caracterizadas pela presença de dois módulos fibronectina tipo II (Fn-II), também denominada domínios ‘BB’. Foram encontradas em várias espécies animais, sendo mais abundante no bovino (BSP; MANJUNATH & SAIRAM, 1987), no caprino (VILLEMURE et al., 2003), bisonte (BISV; BOISVERT et al., 2004), no ovino (RSP; BERGERON et al., 2005) e no equino (HSP-1, HSP-2; CALVETE et al., 1995a,b; MENARD et al., 2003). Também foi descrita no plasma seminal do suíno, onde se encontra em menor quantidade – pB1 (CALVETE et al., 1997a). Mais recentemente foi identificado um grupo de proteínas fibronectina Fn-II, formadas por quatro módulos, originárias do epidídimo e que parecem estar relacionadas com a maturação espermática. No equino esta proteína foi denominada EQ-12 (SAALMAN et al., 2001).

HSP-1 e HSP-2 foram recentemente, denominadas SP-1 e SP-2; (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005a). A caracterização estrutural da HSP-1 equina mostrou que ela é uma proteína que contém o domínio fibronectina tipo II e pertence ao tipo ‘AABB’

caracterizada por dois módulos (BB) e por dois pequenos domínios A, enquanto que a HSP-2 corresponde ao tipo 'ABB' somente com domínio A. HSP-1 e HSP-2 são sintetizadas nas ampolas (SAALMANN et al., 2001; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005a) e tanto a EQ-12 como a SP-1 e SP-2 são associadas à superfície espermática durante o trânsito epididimário e na ejaculação e ambas estão presentes no espermatozoide ejaculado. A abundância de SP-1 foi negativamente relacionada à fertilidade em equinos por Novak et al. (2010).

SP-1 e SP-2 são as proteínas mais abundantes no plasma seminal equino, correspondendo a 70–80% do total de proteínas e são as ortólogas equinas das principais proteínas de ligação à heparina do plasma seminal bovino (BSP), que estão envolvidas na capacitação espermática (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Na ejaculação, as proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II se unem ao espermatozoide mediante interações específicas com os resíduos de colina dos fosfolipídios da membrana do espermatozoide (DESNOYERS & MANJUNATH, 1992; MÜLLER et al., 1998), mediando a capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolipídios (THÉRIEN et al., 1999). Além do espermatozoide, estas proteínas unem-se também a glicosaminoglicanos do trato genital feminino (MANJUNATH et al., 1993). Estas proteínas apresentam a capacidade de ligação à heparina. A heparina é um glicosaminoglicano, isto é, um polissacarídeo de alto peso molecular, que se liga ao espermatozoide bovino através de proteínas e é capaz de induzir a capacitação (LENZ et al., 1983; MILLER et al., 1990). Tal efeito é obtido através da modulação na atividade da proteína à qual ela se liga. Glicosaminoglicanos semelhantes à heparina são secretados, particularmente na fase folicular, pelo trato reprodutivo da fêmea, o que estimula a capacitação (LENZ et al., 1982). Além disso, essas proteínas de ligação à heparina são produzidas pelas glândulas acessórias (NASS et al., 1990) e cobrem a superfície do espermatozoide ejaculado (MILLER et al., 1990). No plasma seminal bovino, as principais proteínas de ligação à heparina são as BSP (proteínas do plasma seminal bovino).

Avaliando a ligação das proteínas BSP, Manjunath et al. (1993a) verificaram que a BSP A1/A2 e a BSP 30 kDa exibiram uma alta atividade quando ligadas à calmodulina, o que pode influenciar no transporte intracelular do Ca^{2+} e na reação acrossomal. Desta forma, as proteínas BSP estariam envolvidas com a capacitação espermática e com a reação acrossomal e, conseqüentemente, com os fenômenos de fertilização.

As proteínas BSP modulam a atividade da fosfolipase A2 e, com isso, regulam o metabolismo dos fosfolipídios da membrana espermática (MANJUNATH et al., 1994). Os sítios de ligação dos colina-fosfolipídios na membrana espermática são substratos para a fosfolipase A2 (PLA2), uma enzima-chave na capacitação (SOUBEYRAND et al., 1998). Posteriormente, foi comprovado que as BSP promovem a capacitação espermática pela remoção do colesterol da membrana plasmática (THÉRIEN et al., 1998; MOREAU et al., 1998; THÉRIEN et al., 1999). Quando isso ocorre, a taxa colesterol/fosfolipídios diminui, acontece o influxo de cálcio e o pH intracelular aumenta. Acredita-se que estes eventos sejam essenciais para que ocorra a reação acrossomal (MC CAULEY et al., 1996; THÉRIEN et al., 1999). Estas proteínas também podem modular os efeitos de outros agentes capacitantes como são a progesterona e a angiotensina-II (FIOL DE CUNEO et al., 2004).

2.3.3 Proteínas da Família das Espermedesinas

As espermedesinas são glicoproteínas de baixo peso molecular (12-16 kDa) compostas por 109 e 133 aminoácidos e constituídas estruturalmente por um único domínio CUB, que serve como suporte estrutural e ao qual se pode atribuir diferentes funcionalidades (ROMERO et al., 1997).

Estas proteínas foram identificadas no suíno (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II) (SANZ et al., 1992; CALVETE et al., 1995a), no bovino - aSFP e Z13 (WEMPE et al., 1992; TEDESCHI et al., 2000), no ovino - espermedesina de 15,5 kDa (BERGERON et al., 2005) e no equino - HSP-7 (REINERT et al., 1996), sendo o principal componente proteico do plasma seminal no suíno. Nessa espécie, as espermedesinas representam mais de 90% das proteínas do plasma seminal.

As espermedesinas AWN, AQN-1 e AQN-3 do suíno são proteínas de ligação ao espermatozoide e parecem estar envolvidas nos eventos mediados por carboidratos que ocorrem na fertilização (WAGNER et al., 2002; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005a).

HSP-7 é a espermedesina equina homóloga a AWN suína. Sua sequência mostrou a troca de aminoácidos em apenas três posições (REINERT et al., 1996; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2002). Como é homóloga a AWN suína, é uma proteína de ligação a carboidratos. Mostrou propriedades de ligação à zona pelúcida equina, demonstrando seu papel na interação espermatozoide-zona pelúcida. Em

contraste com a AWN suína, foi primeiramente detectada na espermatogônia, depois na *rete testis*, no epidídimo e nas vesículas seminais. Também foi isolada em alguns espermatozoides testiculares (REINERT et al., 1997; HOSHIBA & SINOWATZ, 1998). Durante a passagem pelo epidídimo, acontece um aumento da HSP-7 associada ao espermatozoide, aparecendo como uma banda proeminente no segmento equatorial (REINERT et al., 1997).

2.3.4 Outras Proteínas do Plasma Seminal Equino

Existem outras proteínas presentes no plasma seminal equino e que contribuem para a concentração total de proteínas do plasma seminal. As principais, quando isoladas, foram designadas proteínas do plasma seminal equino (do HSP-1 ao HSP-8) e possuem baixo peso molecular (de 14 a 30 kDa). Com exceção da HSP-4, todas apresentam propriedades de ligação ao espermatozoide e podem ser isoladas no espermatozoide ejaculado.

HSP-1, HSP-2 e HSP-5 a HSP-8 apresentam propriedade de ligação à heparina e como são encontradas na superfície espermática, podem possuir um papel na fertilização.

HSP-1 e HSP-2 (recentemente, denominadas SP-1 e SP-2; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005a) já foram mencionadas nas proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II (Fn-II). A HSP-3 foi também abordada nas proteínas ricas em cisteína (CRISP) e a HSP-7 é a espermedesina equina homóloga a AWN suína, que já foi citada na família das espermedesinas.

HSP-4 é uma proteína relacionada ao produto semelhante ao gene da calcitonina e os níveis de calcitonina foram correlacionados com a motilidade espermática (MUNGAN et al., 2001), a prevenção da capacitação prematura e a reação acrossômica espontânea, através do sistema adenilciclase/cAMP (FRASER et al., 2005).

HSP-5 ainda não foi relacionada a nenhuma proteína conhecida. A sequência do N-terminal nem a funcionalidade são encontradas em proteínas de outras espécies (TÖPPFER-PETERSEN et al., 2005).

HSP-6 e HSP-8 são diferentes isoformas de uma mesma proteína, que pertence à família das calicreínas. Em garanhões, quantidades maiores de calicreína 1E2 (KLK2) foram relacionadas negativamente com a fertilidade (NOVAK et al., 2010). As sequências do N-terminal de ambas isoformas mostraram alto grau de homologia com o

antígeno prostático humano (PSA), que está envolvido na clivagem do coágulo seminal (JONSSON et al., 2005).

Também foi descrito um número de pequenas proteínas do plasma seminal equino, como a lactoferrina (INAGAKI et al., 2002), que é originária do testículo e foi encontrada também no cão (KIKUCHI et al., 2003) e, assim como a leptina e os fatores de crescimento, podem promover a longevidade do espermatozoide (LACKEY et al., 2002; CHAMPION et al., 2002) e várias enzimas como a lipase (CARVER & BALL, 2002), 1,4-glicosidase (DIAS et al., 2004) e a enzima de conversão da angiotensina (BALL et al., 2003).

2.3.5 Proteínas do Plasma Seminal Relacionadas a Congelabilidade do Sêmen

Várias proteínas do plasma seminal bovino têm influência na congelabilidade do sêmen. Roncoletta et al. (1997), através da análise das proteínas do plasma seminal por eletroforese unidimensional, verificaram um polipeptídeo de 51 kDa de peso molecular presente em 100% dos reprodutores de alta congelabilidade e ausente em 75% dos animais de baixa congelabilidade. Posteriormente, utilizando a mesma metodologia, Roncoletta (1999) relacionou o polipeptídeo de 61 kDa com a congelabilidade do sêmen e identificou, através de imunodeteção, uma proteína de 26 kDa, como sendo a prostaglandina D-sintetase tipo lipocalina, essa proteína apresentou quantidade significativamente superior no plasma seminal dos reprodutores com superior congelabilidade do sêmen (RONCOLETTA et al., 2000). A prostaglandina D sintetase tipo lipocalina já foi relacionada por Killian et al. (1993) à fertilidade de reprodutores.

Jobim (2001) encontrou a BSP A1/A2, a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), a clusterina, a albumina e a osteopontina (OPN) como proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen. A abundância de clusterina foi identificada por Novak et al. (2010) como sendo negativamente relacionada à fertilidade em garanhões.

A remoção de moléculas com pesos moleculares menores que 8 kDa do plasma seminal do galo também poderia aumentar a fertilidade do sêmen resfriado. Porém, o mesmo não acontecia quando o sêmen era submetido à criopreservação (VAN VOORST & LEENSTRA, 1994).

Outras proteínas, como as do plasma seminal do carneiro, após incubação, ligam-se à membrana plasmática do espermatozoide, revertendo os danos induzidos pelo frio

na célula espermática. Essa adsorção de proteínas, que reparam a superfície celular, é um processo dependente da concentração de proteína no meio de incubação. Após fracionamento das proteínas do plasma seminal, foi verificado que três frações tinham esta capacidade e, através de microscopia eletrônica, foi confirmada a alta atividade de uma fração que reconstituía aproximadamente 50% da membrana plasmática. Diferenças na composição destas três frações resultaram de uma banda principal de aproximadamente 20 kDa, que deve ser a responsável pela reconstituição das características de permeabilidade da membrana do espermatozoide (BARRIOS et al., 2000).

O perfil proteico do plasma seminal equino, no entanto, ainda não foi correlacionado com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional.

2.4 A Eletroforese

O mapeamento e identificação dos componentes proteicos do ejaculado, através da técnica de eletroforese, vêm sendo utilizados desde a década de 50 (LARSON & SALISBURY, 1954; SZUMOWSKI, 1956; BENNET, 1965). Inicialmente, foi utilizada a eletroforese em soluções de sacarose (LARSON & SALISBURY, 1954); após, foi substituída pelos géis de amido (VESSELINOVITCH, 1959). Através da eletroforese em géis de poliacrilamida (uni ou bidimensionais), a técnica vem sendo utilizada com sucesso até os dias de hoje.

Utilizando a eletroforese unidimensional, o perfil proteico do plasma seminal bovino foi correlacionado com padrões de fertilidade normais (AX et al., 1985; NASS et al., 1990) e alterados (ROCHA et al., 1974; WOLFE et al., 1993), com a congelabilidade (RONCOLETTA et al., 1997; RONCOLETTA et al., 2000; JOBIM, 2001; JOBIM et al., 2004) e com a viabilidade do sêmen (AURICH et al., 1996).

Desde o desenvolvimento, há mais de 35 anos, da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) por Klose (1975) e O'Farrell (1975), esta tem sido a técnica de escolha para a análise de proteínas em uma variedade de células, tecidos e líquidos. A 2D-PAGE promove uma análise proteica de alta resolução e, portanto, possui um papel central na proteômica (CELIS & GROMOV, 1999), a área que estuda a compreensão e a representação de proteínas expressas por um genoma, em um determinado momento. Enquanto que o genoma é estático, seu proteoma correspondente é responsivo e dinâmico e varia amplamente entre organismos (CHOE et al., 2006). Este

novo campo de pesquisa envolve a combinação de várias técnicas para separar (eletroforese), identificar (espectrometria de massa, *Immunoblotting*), quantificar e armazenar (análise de imagens, *softwares*) dados e informações (NOOIJ et al, 1990; BERGQUIST et al., 2007; WU et al., 2007). O proteoma responde e reflete influências ambientais, estágios de desenvolvimento e o *status* sanitário (CHOE et al., 2006). A proteômica, juntamente com a genômica, bibliotecas de anticorpos e a bioinformática, formam um conjunto de tecnologias impressionantes para o estudo da expressão gênica, tanto em animais saudáveis, como nos doentes. A proteômica tem recebido força para o desenvolvimento de tecnologias com a finalidade de estudar doenças e medicamentos, através da marcação de proteínas-alvo (CELIS & GROMOV, 1999).

A técnica 2D-PAGE separa as proteínas em duas etapas e o seu poder de resolução é muito superior ao da eletroforese unidimensional. A 2D-PAGE pode ser utilizada para comparar perfis de expressão proteica e quantificar e qualificar as proteínas detectadas (CELIS & GROMOV, 1999). Os perfis proteicos podem ser escaneados e quantificados para pesquisar diferenças, como nos níveis de expressão e os resultados interessantes podem ser identificados, através do sequenciamento de peptídeos através de espectrometria de massa (GROSSERT, 2001; BERGQUIST et al., 2007) ou *Immunoblotting* (NOOIJ et al, 1990). Enquanto que cada dimensão sozinha consegue separar em média 200 tipos de proteínas diferentes, o uso sequencial de duas dimensões possui a capacidade de separar em torno de 10.000 proteínas, em uma única amostra (MIKLOS & MALESKA, 2001). Isso é muito relevante, uma vez que as células eucariotas consistem em um arranjo de, no mínimo, 10.000 proteínas diferentes e exibem uma margem ampla de concentrações (GÖRG et al., 2004). Outra vantagem da eletroforese bidimensional ocorre nos casos de limitação de amostra, pois as proteínas separadas podem ser arquivadas nos géis, indefinidamente, depois de gravadas suas imagens. Isto permite a caracterização das proteínas em uma data posterior, sem a necessidade de repetir o experimento (CHOE et al., 2006).

Os trabalhos de 1975 combinaram duas metodologias pré-estabelecidas, a de focalização isoeletrica (IEF) e a de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), em um formato bidimensional que separa as proteínas de forma efetiva na primeira dimensão pelo ponto isoeletrico e na segunda dimensão, de acordo com o peso molecular (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975).

A eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida representa uma técnica valiosa na separação e caracterização das proteínas. Através deste método, muitas

proteínas do plasma seminal de várias espécies foram descritas e caracterizadas (KILLIAN et al., 1993; DESNOYERS et al., 1994; FRAZER & BUCCI, 1996; FRAZER et al., 1996; MORTARINO et al., 1998; FLOWERS, 1998; BRANDON et al., 1999). Na área da reprodução, esta técnica tem sido utilizada para a determinação de marcadores da fertilidade e congelabilidade no sêmen de touros (JOBIM et al., 2004; MOURA et al., 2007) e da suscetibilidade à endometrite em éguas (MALSCHITZKY et al., 2007a; MALSCHITZKY et al., 2007b; MALSCHITZKY et al., 2008, WOLF, 2011).

O perfil proteico do plasma seminal equino, no entanto, ainda não foi correlacionado com a congelabilidade do sêmen, utilizando eletroforese bidimensional.

2.5 Espectrometria de Massa

A Espectrometria de Massa foi criada há 100 anos, pelo ganhador do Prêmio Nobel Sir J. J. Thompson, que identificou íons de pequena massa molecular em um espectrógrafo de massa. Desde então, esta técnica tem sido utilizada em situações diversas, mas tornou-se mais proeminente nos últimos anos, no campo de identificação de proteínas. O objetivo da técnica é identificar as proteínas, codificadas por genes e determinar suas funções no organismo hospedeiro (BERGQUIST et al., 2007).

A Espectrometria de Massa (MS) tem tornado-se cada vez mais a técnica de escolha para a análise de amostras complexas de proteínas. A proteômica, utilizando a MS se torna viável pela disponibilidade de base de dados de sequências de genes (genoma) e avanços técnicos e conceituais em muitas áreas, como a descoberta e desenvolvimento de métodos de ionização de proteínas, reconhecidos com o prêmio Nobel de 2002 em química (AEBERSOLD & MANN, 2003).

Há dez anos, para sequenciar uma proteína, quantidades consideráveis precisavam ser purificadas e uma técnica conhecida como degradação de Edman era utilizada. No entanto, este método falha completamente quando a proteína é acetilada em seu grupo amino terminal ou se este for bloqueado, pois esta reação requer grupos aminos terminais livres. Durante a década de 90, a Espectrometria de Massa, substituiu a degradação de Edman, isso porque a técnica de MS é muito mais sensível e pode fragmentar peptídeos em segundos, ao invés de horas ou dias.

Espectrômetros de massa podem medir a massa de proteínas intactas, no entanto, realiza-se o sequenciamento de peptídeos ao invés de proteínas, uma vez que a

sensibilidade do espectrômetro de massa para proteínas é bem menor que para peptídeos. Os peptídeos quando ionizados e analisados por um espectrômetro de massa geram, além do íon molecular, íons provenientes de fragmentações internas das suas moléculas 19, os quais são: íons N-terminal e C-terminal (STEEN & MANN, 2004).

As vantagens das técnicas de MS incluem sensibilidade, rapidez e aplicação a misturas complexas. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos, a MS tem sido destacada não apenas para estudos de estruturas primárias de proteínas, mas também como a tecnologia central para o campo de proteômica (STEEN & MANN 2004).

Medidas por MS são efetuadas a partir de analitos ionizados e ejetados para dentro de um espectrômetro de massa. Por definição, um espectrômetro de massa consiste em uma fonte de íons, um analisador de massa que mede a razão massa/carga (m/z) de um analito ionizado e um detector que registra o número de íons em cada valor de m/z . Ionização por *eletrospray* (ESI) e Ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS: *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*) são as duas técnicas mais comumente utilizadas para ionizar as proteínas ou peptídeos para análise por espectrometria de massa. A técnica ESI consiste em transferir analitos ionizados da solução para a fase gasosa sendo, portanto facilmente acoplada a técnicas de separação líquida (por exemplo, separação cromatográfica líquida e eletroforética). A técnica de MALDI dessorve e ioniza as amostras a partir de pulsos de laser com o auxílio de uma matriz cristalina e seca. MALDI-MS é normalmente utilizada para analisar misturas relativamente simples de peptídeos, enquanto que ESI-MS (LC-MS) são sistemas preferíveis na análise de amostras complexas (AEBERSOLD & MANN, 2003).

As análises proteômicas são hoje uma ferramenta valiosa na determinação da presença de biomarcadores ou no mapeamento de perfil dos mesmos dentro de grupos de amostras diferentes, por exemplo, em indivíduos doentes e saudáveis, de alta e baixa fertilidade, assim como de alta e baixa congelabilidade. O resultado final de um experimento é uma lista de peptídeos que são regulados com aumento ou decréscimo entre os dois grupos. A determinação da variação na concentração relativa e absoluta é fundamental para a descoberta de biomarcadores válidos.

Métodos de obtenção de perfil proteico e MALDI-MS são duas técnicas relativamente novas (REYZER & CAPRIOLI, 2007) e que têm sido utilizadas na descoberta de biomarcadores proteicos. As proteínas são provavelmente as moléculas mais afetadas quando as doenças são diagnosticadas; além de refletirem a fisiologia

celular (AEBERSOLD et al, 2005), também podem refletir fertilidade e congelabilidade e há uma grande expectativa na descoberta de muitos biomarcadores proteicos.

2.6 A Criopreservação do Sêmen

Os primeiros resultados, obtidos na inseminação artificial com utilização de sêmen congelado foram alcançados por Polge & Rowson, em 1952 e, em equinos, a primeira congelação de sêmen bem sucedida ocorreu em 1950. No entanto, somente em 1957 que Barker e Gandier relataram a primeira concepção decorrente de inseminação com sêmen congelado. A partir desta data, a tecnologia da criopreservação tem apresentado desenvolvimento notório: melhoramento na qualidade e na fertilidade do sêmen após o processamento. Apesar de avanços tecnológicos, a inseminação artificial ainda encontra barreiras no que se refere à congelação do sêmen (AURICH et al., 1996, LOOMIS, 2001).

A criopreservação é o processo para preparação de uma suspensão de células para estocagem: refrigeração ou congelação (em temperaturas inferiores a -80°C), que posteriormente retornam a temperaturas próximas à do organismo. Embora a técnica permita a sobrevivência, pode causar prejuízo à função e até mesmo a morte celular.

Os princípios biofísicos aplicados à criopreservação de células e tecidos vivos são empregados também na congelação de espermatozoides. Durante o processo da criopreservação e/ou descongelamento ocorrem danos provocados pelas baixas temperaturas a que são submetidos os espermatozoides. Entre estes danos estão: a formação de cristais de gelo intracelulares; o aumento da concentração intracelular de solutos e as correlacionadas, resultantes da desidratação celular durante o processo de congelação. A lesão celular pode ser causada diretamente, afetando estruturas celulares (ruptura de membranas), ou indiretamente, alterando as funções celulares através do processo metabólico (HOLT, 2000).

Em condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir à excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento da membrana (AMANN & GRAHAM, 1992). Na membrana espermática, esse estresse está relacionado à fase de transição dos lipídeos, a qual altera o estado funcional da membrana (HOLT, 2000). Quando a temperatura é reduzida, os lipídeos sofrem uma fase de transição de um estado fluido, na qual a interação entre as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas,

para um estado de gel, no qual a cadeia de ácidos graxos torna-se rígida e paralela (AMANN & GRAHAM, 1992). Os efeitos causados pela fase de transição dos lipídeos provocam respostas cinéticas não lineares em algumas enzimas, incluindo algumas ATPases de membrana, cuja atividade depende do estágio físico dos lipídeos (HOLT, 2000).

Os eventos ocorridos (alterações nas membranas na fase de transição) são parcialmente revertidos no descongelamento (HOLT & NORTH, 1984; DE LEEUW et al., 1990). A temperatura aumenta e, em consequência, a membrana plasmática é submetida a redistribuições estruturais, envolvendo lipídeos e proteínas (HOLT, 2000).

Outros componentes da membrana podem ser alterados pelo estresse da temperatura. As proteínas da membrana são agrupadas na fase de transição lipídica e é esperado que isso altere a função, especialmente das proteínas que sofrem modulação estrutural para realizar sua função, como os canais iônicos proteicos (HOLT, 2000).

Também a permeabilidade da membrana aumenta no resfriamento (ROBERTSON & WATSON, 1986), devido ou ao incremento nas alterações da membrana ou a efeitos específicos nos canais proteicos. A regulação do cálcio é afetada pela refrigeração, o que provoca sérias consequências na função celular (BAILEY & BUHR, 1994), sendo as alterações, em alguns casos, incompatíveis com a viabilidade da célula. A 5°C aumenta a permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} : ele se acumula na célula, contribuindo para alterações semelhantes às ocorridas no processo da capacitação e nos eventos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana externa do acrossoma (WATSON, 1995).

Existem muitas semelhanças entre os danos à membrana ocorridos na criopreservação e na reação acrossômica: uma é a versão desorganizada da outra (WATSON, 2000). O aumento do Ca^{2+} , que acontece na criopreservação, é típico do espermatozoide capacitado, mas a fosforilação da tirosina, que ocorre no processo da capacitação, é distinta da ocorrida no processo da congelamento (WATSON, 2000).

Os elementos do citoesqueleto da célula também são sensíveis à temperatura. Spungin et al. (1995) postularam que a despolimerização da actina F do citoesqueleto é necessária para permitir a aproximação da membrana plasmática com a membrana externa do acrossoma, promovendo a exocitose do conteúdo acrossomal, talvez contribuindo para a fusão desorganizada das membranas que ocorre na criopreservação (HOLT, 2000).

Alterações significativas na pressão osmótica, meio ao qual o espermatozoide é submetido, ocorrem na criopreservação. O estresse induzido pela formação dos cristais de gelo é principalmente associado com alterações na pressão osmótica na fração não-congelada (WATSON & DUCAN, 1988). A água congela e cristaliza como gelo fora da célula; a pressão osmótica do remanescente líquido do soluto aumenta e a membrana espermática é extremamente sensível ao estresse osmótico (WATSON, 2000), o que pode também afetar o citoesqueleto celular (WATSON, 1995). Efeitos similares acontecem no descongelamento (HOLT, 2000).

2.6.1 Crioprotetores Utilizados na Espécie Equina

Numerosos diluentes são utilizados para resfriar, armazenar, transportar e congelar o sêmen de garanhões e sua finalidade é favorecer a longevidade máxima de fertilidade das células espermáticas, embora se saiba que há significativa variação e imprevisibilidade de tolerância frente aos diluentes e técnicas de resfriamento e congelamento. Não existe seleção para fertilidade do sêmen congelado em garanhões (LOOMIS & GRAHAM, 2008) e resultados de vários estudos indicam que de 20% a 50% dos garanhões possuem sêmen com baixa congelabilidade (TISCHNER, 1979; AMANN & PICKETT, 1987; MÜLLER, 1987; VIDAMENT et al., 1997). Segundo PALMER (1984), apenas 50% dos garanhões apresentam boas taxas de fertilidade após o descongelamento. Resultados têm demonstrado taxas de prenhez por ciclo entre 38% e 73% (METCALF, 1995; VIDAMENT, 2005; NIELSEN et al., 2008) e taxas de prenhez por temporada de 76% a 82% (BARBACINI et al., 1999; LOOMIS, 2001).

Atualmente existem várias técnicas de diluição, resfriamento e congelamento sendo empregadas na espécie equina, com diferentes taxas de sucesso. Em um levantamento, Alvarenga et al. (1996) demonstraram a existência dos fatores raciais e individuais relacionados com resistência à congelação na espécie equina. Estes índices dependem da tolerância do sêmen do reprodutor frente ao diluente ou da técnica utilizada, além de fatores ligados à égua e ao manejo dos animais (PICKETT & AMANN, 1987).

Com a aceitação do uso de sêmen congelado por muitas associações de raça na última década, houve uma renovação e estímulo a pesquisas sobre protocolos para congelação de sêmen de garanhões (ALVARENGA et al., 2005). No entanto, na espécie equina, a biotecnologia de criopreservação do sêmen se depara com a grande variação

entre ganhões e ejaculados de um mesmo ganhão em resistir aos fenômenos físico-químicos inerentes à congelação. Em vista disso, muitos estudos têm buscado aumentar a eficiência do processo de congelação através do aperfeiçoamento de diluentes, protocolos de processamento do sêmen e metodologias de inseminação (DE VITA, 2008).

Alvarenga et al. (2005) afirmaram que a indústria equina utilizará o sêmen congelado em larga escala somente quando a fertilidade deste for melhorada. Dessa forma, vários procedimentos são testados, a fim de melhorar a qualidade seminal pós-descongelação.

A sobrevivência espermática à criopreservação requer a solução de uma equação multifatorial, sendo que a preservação de componentes celulares como membrana plasmática, acrossomo, mitocôndria, citoesqueleto, núcleo e glicocálix são fatores incluídos neste processo (GRAHAM, 1996). Portanto torna-se indispensável a aplicação de procedimentos que evitem ao máximo lesões à célula espermática durante o processamento do sêmen para fins de armazenamento e inseminação artificial, já que o número de fatores capazes de afetar a integridade da membrana plasmática aumenta nestas situações (AURICH, 2005).

Para atenuar os efeitos deletérios do processo de resfriamento, congelação e descongelação, vários procedimentos são adotados para, conjuntamente, atuarem na preservação celular (AMANN & PICKETT, 1987; KATILA 1997).

A incorporação de crioprotetores aos meios diluentes tem como intuito a proteção dos espermatozoides durante o ciclo de congelação/dcongelação. Uma gama de substâncias tem sido utilizada para fornecer proteção às células espermáticas (SQUIRES et al., 1999). A maioria dos meios diluentes para congelação de sêmen contém uma fonte de lipoproteínas, através da incorporação de produtos do leite, gema de ovo ou uma combinação destes dois ingredientes, que auxiliam na estabilização das membranas durante os ciclos da congelação/dcongelação. Monossacarídeos (glicose ou frutose), dissacarídeos (sacarose ou lactose) e trissacarídeos (rafinose) também são comumente incorporados. Os dissacarídeos e trissacarídeos são açúcares não permeáveis, usados principalmente por suas propriedades osmóticas. Os monossacarídeos também possuem efeitos osmóticos, porém eles podem ser utilizados pelos espermatozoides como uma fonte de energia. Entre os crioprotetores penetrantes, o glicerol é o crioprotetor universalmente utilizado, embora outros agentes estejam sendo empregados, como dimetilsulfóxido, etilenoglicol, metilformamida e

dimetilformamida (VARNER, 2003). Outros componentes como EDTA, detergentes, tampões e antibióticos também são incluídos nos meios (COTORELLO & HENRY, 2002).

Os crioprotetores são classificados em penetrantes e não-penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são substâncias que atuam tanto no meio intra quanto no extracelular, sendo comumente utilizados os álcoois (glicerol e etilenoglicol), dimetilsulfóxido (DMSO) e amidas (metilformamida e dimetilformamida). Já os crioprotetores não penetrantes são alguns açúcares, lipídeos e lipoproteínas, que protegem a célula sem a necessidade de penetração, através de mecanismos osmóticos que induzem à desidratação celular e previnem a formação de gelo intracelular (AMANN & PICKETT, 1987; KEITH, 1998).

Embora os crioprotetores intracelulares sejam fundamentais para a sobrevivência espermática, eles podem exercer efeitos tóxicos com influência nas taxas de fertilidade. Entre os efeitos nocivos relatam-se o aumento da permeabilidade e indução da fusão da membrana plasmática; inibição da atividade enzimática; desnaturação de proteínas; alterações na interação da actina, polimerização da tubulina e associação dos microtúbulos; distúrbio no balanço bioenergético; associação com o glicocálix e proteínas da superfície celular (FAHY et al., 1990; HAMMERSTEDT & GRAHAM, 1992; ROSSI et al., 2003).

A utilização de diversos crioprotetores e combinações podem minimizar e controlar seus efeitos deletérios, possibilitando resultados mais satisfatórios de motilidade e viabilidade pós-descongelamento com melhores taxas de concepção (MEDEIROS et al., 2002; ROSSI et al., 2003).

Desde a descoberta do glicerol como um agente crioprotetor eficiente, o sêmen de uma variedade de animais domésticos, de laboratório e silvestres, assim como do homem, tem sido congelado e usado para inseminação artificial, tornando o glicerol o crioprotetor rotineiramente utilizado (PARKS & GRAHAM, 1992; ALVARENGA et al., 2005). No entanto, cabe ressaltar que dados apresentados por Medeiros et al. (2007) demonstraram que as amidas são superiores ao glicerol em preservar a motilidade e a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de equinos quando submetidos ao estresse osmótico. Acredita-se que a menor viscosidade associada ao menor peso molecular das amidas facilite a permeabilidade do crioprotetor através da membrana, evitando a formação de um gradiente osmótico.

As amidas possuem um mecanismo de ação crioprotetor diferente do glicerol, devido a sua estrutura molecular e sua habilidade de permear a membrana celular. O mecanismo de ação das amidas é devido a seu grupamento funcional amina, o qual contém nitrogênio, portanto, quimicamente distinto do grupamento funcional do glicerol que são as hidroxilas. As amidas realizam ligações de hidrogênio com a molécula da água em três sítios de ligação. Além disso, devido ao menor peso molecular e viscosidade das amidas em relação ao glicerol, elas possuem maior permeabilidade de membrana, diminuindo a possibilidade de danos celulares causados por estresse osmóticos (BALL & VO, 2001). Desta forma supõe-se que as amidas possuam uma forma mais eficaz de realizar a coligação com a molécula da água, desempenhando um mecanismo crioprotetor celular mais eficiente que o glicerol (BALL & VO, 2001).

Deve ser considerado que os protocolos de criopreservação de sêmen equino não são padronizados e o sucesso da preservação varia substancialmente (SAMPER & MORRIS, 1998). Geralmente os resultados são menores quando comparados a outras espécies. Um dos pré-requisitos para uma preservação bem sucedida de sêmen equino é a alta qualidade inicial. Essa qualidade mostra diferenças consideráveis entre garanhões e a evidente variação na congelabilidade de sêmen de garanhões é um dos fatores que mais determina o sucesso da inseminação artificial com sêmen congelado (SAMPER et al., 1991; BLOTTNER et al., 2001).

Os indivíduos podem ser classificados como produtores de sêmen de alta e baixa congelabilidade, dependendo das características estruturais da membrana, o que é geneticamente determinado, predispondo à sobrevivência aos estresses da criopreservação (WATSON, 2000).

3 ARTIGO

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 765-771, 2011. (APÊNDICE G)

Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida do plasma seminal equino e sua relação com a congelabilidade do sêmen

M. I. M. Jobim^{1*}, C. Trein¹, H. Zirkler², R. M. Gregory¹, H. Sieme³, R. C. Mattos¹

¹*REPROLAB, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.*

²*Haras Estatal de Celle, Alemanha*

³*Clinic for Horses - Reproductive Unit of Clinics, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany*

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil proteico do plasma seminal equino utilizando eletroforese bidimensional de gel de acrilamida (2D-PAGE) e determinar se algumas das proteínas presentes estavam relacionadas com a congelabilidade do sêmen. O plasma seminal foi coletado de 10 garanhões, de alta e baixa congelabilidade de sêmen, provenientes do Haras Estatal da Baixa Saxônia, na cidade de Celle, na Alemanha e rotineiramente utilizados em programas de inseminação artificial. Vinte e cinco bandas proteicas foram encontradas nos géis bidimensionais (12%) e sete delas foram identificadas por MALDI-MS. Das 25 proteínas encontradas nas amostras de plasma seminal dos garanhões, duas bandas proteicas apresentaram densidade óptica superior ($P < 0,05$) nas amostras de garanhões de alta congelabilidade o sêmen: as bandas 5 (80-85 kDa, pI 7,54) que foi identificada como CRISP-3 e a 45 (18,2 kDa, pI 5,0-5,2) identificada como HSP-2. Contrariamente a banda 7 (75,4 kDa, pI 6,9 – 7,4) identificada como lactoferrina, a 15 (26,7 kDa, pI 5,51) identificada como calicreína, a 25 (25 kDa, pI 7,4) como CRISP-3 e a 35 (13,9 kDa, pI 3,8 – 4,2) que foi identificada como HSP-1, apresentaram valores de densidade óptica superior ($P < 0,05$) nos reprodutores de baixa congelabilidade do sêmen. As proteínas foram identificadas através de espectrometria de massa MALDI-MS. As evidências encontradas neste experimento mostram que existem diferenças no perfil proteico dos reprodutores de alta

e baixa congelabilidade do sêmen, sugerindo as proteínas CRISP-3 e a HSP-2 como possíveis marcadores da alta congelabilidade de sêmen de garanhões.

Palavras-chave: CRISP-3, HSP-1, HSP-2, lactoferrina, calicreína, eletroforese bidimensional

Abstract

The objective of this study was to evaluate protein profile of equine seminal plasma using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and to find if any of these proteins was related with semen freezability. Seminal plasma was collected from 10 stallions of high and low semen freezability routinely used in AI programs from the State Stud of Lower Saxony an Artificial Insemination Center. Twenty five protein spots were found in the 2 D gel (12%) and seven of which were identified by MALDI-MS. Of the 25 proteins found in the research stallions, two spots showed superior relative content ($P < 0.05$) in seminal plasma samples collected from stallions with high semen freezability: the spots 5 (80-85 kDa, pI 7.54) was identified as CRISP-3 and 45 (18.2 kDa, pI 5.0-5.2) was identified as HSP-2. Conversely, the spot 7 (75.4 kDa, pI 6.9 – 7.4) was identified as lactoferrin, 15 (26.7 kDa, pI 5.51) was identified as kallikrein, 25 (25 kDa, pI 7.54) was identified as CRISP-3 and 35 (13.9 kDa, pI 3.8 – 4.2) was identified as HSP-1, showed superior relative protein content ($P < 0.05$) on seminal plasma samples from stallions with low semen freezability. The Proteins were identified by MALDI-MS. There were differences in the seminal plasma protein profile from stallions with high and low semen freezability. It may be suggested that CRISP-3 and HSP-2 may be considered possible seminal plasma markers of high semen freezability.

Key-words: CRISP-3, HSP-1, HSP-2, lactoferrin, kallikrein, two-dimensional electrophoresis

1. Introdução

As proteínas do plasma seminal são produtos da secreção principalmente do epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Existem evidências diretas de que algumas destas proteínas desempenham múltiplos efeitos tanto na função espermática como no trato genital feminino [1]. As proteínas do plasma seminal equino foram caracterizadas nas duas últimas décadas. Amann et al. [2] relataram proteínas do plasma seminal equino com pesos moleculares entre 13 e 122 kDa; e utilizando SDS-PAGE, demonstraram uma baixa correlação entre a presença de duas proteínas no sêmen fresco e a motilidade pós-descongelamento. Brandon et al. [3] detectaram 14 proteínas através de eletroforese bidimensional. Algumas destas proteínas foram correlacionadas com a fertilidade de alguns garanhões [3].

As principais proteínas do plasma seminal equino, que constituem a maioria do conteúdo total de proteína do plasma seminal foram caracterizadas por Calvete et al. [4]. Essas proteínas isoladas, designadas como proteínas do plasma seminal equino (HSP-1 a HSP-8), possuem baixo peso molecular (14 a 30 kDa). Com exceção da HSP-4, todas apresentam propriedades de ligação ao espermatozoide. As proteínas HSP-1, HSP-2 e HSP-5 até HSP-8, também possuem habilidade de ligação com a heparina e estão associadas à superfície espermática, indicando um importante papel na fertilização [1]. As proteínas HSP-1 e HSP-2 (recentemente denominadas SP-1 e SP-2, respectivamente [5]) são as proteínas que estão em maior quantidade no plasma seminal equino, perfazendo de 70% a 80% do total. Elas pertencem à família das fibronectinas tipo II (Fn-2) [6], que são proteínas ortólogas as principais proteínas de ligação à heparina nos bovinos (BSP). A HSP-3 é membro da família das proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) [7]. A proteína do plasma seminal equino HSP-4 foi descrita como um produto relacionado ao gene da calcitonina. A proteína HSP-5 não pode ser relacionada a nenhum outro tipo de proteína conhecida. As HSP-6 e HSP-8 são isoformas de uma proteína que pertence à família das calicreínas, enquanto a HSP-7 é a homóloga equina da espermadesina AWN-1 do suíno [8].

A contribuição das proteínas do plasma seminal à congelabilidade do sêmen foi relatada em machos das diversas espécies, inclusive bovinos [9-12], ovinos [13,14], bubalinos [15,16] e suínos [17]. Entretanto, as informações sobre as proteínas do plasma seminal equino e a relação com a congelabilidade do sêmen ainda são limitadas. Além disso, o perfil proteico do plasma seminal equino ainda não foi correlacionado a

congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional com gel de poliacrilamida.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o perfil proteico do plasma seminal equino dos garanhões utilizados em programas de Inseminação artificial no Haras Estatal da Baixa Saxônia, em Celle, Alemanha, utilizando eletroforese bidimensional SDS-PAGE e determinar se este perfil proteico está correlacionados à congelabilidade do sêmen.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e processamento das amostras

O plasma seminal foi obtido de 10 garanhões Hanoverianos do Haras Estatal da Baixa Saxônia. Os garanhões tinham fertilidade comprovada e eram utilizados rotineiramente em programas de inseminação artificial. Os animais foram mantidos em condições similares de manejo e alimentação. Os garanhões foram divididos em dois grupos, baseado em seus parâmetros espermáticos de congelabilidade de sêmen: alta (n=5) e baixa (n=5), utilizando os dados fornecidos pela central de inseminação. Na central de inseminação, a motilidade progressiva mínima padrão para o sêmen pós-descongelamento é de pelo menos 35%, baseado em um sistema de análise de sêmen computadorizada (Stroemberg-Mika, Montreux, CH). Garanhões com alta congelabilidade tiveram mais de 30% de ejaculados viáveis após descongelamento. Ao contrário, os garanhões classificados como de baixa congelabilidade apresentaram menos de 30% dos ejaculados viáveis após descongelamento.

Foram coletados dois ejaculados de cada garanhão. Após remover uma amostra de 2 mL para o experimento (ver sessão 2.2 Eletroforese), o sêmen foi congelado por 24 horas e então descongelado. Ao descongelamento, os garanhões de alta congelabilidade do sêmen apresentaram uma média de $63,0\% \pm 9,4$ de motilidade progressiva, $50,9 \pm 7,8 \mu/\text{sec}$ de velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), $110,2 \pm 16,7 \mu /\text{sec}$ de velocidade curvilínea (VCL) e $42,4 \pm 5,8 \mu /\text{sec}$ de velocidade progressiva (VSL). Os garanhões com baixa congelabilidade, as médias após o descongelamento foram $33,9\% \pm 11,9$ de motilidade progressiva, $27,2 \pm 8,2 \mu/\text{sec}$ de velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), $63,4 \pm 19,3 \mu /\text{sec}$ de velocidade curvilínea (VCL) e $22,2 \pm 6,9$

μ /sec de velocidade progressiva (VSL). Todos os dados apresentaram diferenças estatísticas entre os dois grupos.

A alíquota de 2 mL de sêmen foi centrifugada a 1500 x g por 15 a 20 minutos para obtenção do plasma seminal. O sobrenadante foi acondicionado em criotubos e armazenado em nitrogênio líquido até sua utilização. Posteriormente as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10.000 x g por 60 minutos a 4°C e uma alíquota de 50 μ L do sobrenadante foi armazenada em criotubos a -70 °C. A concentração de proteína total das amostras foi determinada conforme descrito por Lowry et al. [18], utilizando como padrão albumina sérica bovina (1 mg/mL).

2.2. Eletroforese

As amostras de plasma seminal foram submetidas, em duplicata, à eletroforese bidimensional em gel de acrilamida (2D-PAGE), conforme descrito por O'Farrel et al.[19] e modificado por Rodnigh et al. [20]. A solução utilizada para a separação em primeira dimensão continha 9 mol/L de ureia, 12,5 mmol/L de lisina, 7 mmol/L de dodecil sulfato de sódio (DSS) (Sigma Chemical, St. Louis MO, USA), 4% (vol/vol) de Igepal e 2% (vol/vol) de 2-mercaptoetanol. A primeira dimensão constituía-se de eletroforese não equilibrada (NEPHGE) em gel de poliacrilamida a 3,5% de acordo com o método previamente descrito [22], com gradiente de pH de 3 a 10 (Amersham, Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden).

Foi aplicada uma quantidade de 60 μ g de proteína em cada tubo e foi usado como marcador de frente de corrida o citocromo C (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). A fonte utilizada foi EPS 35011 com voltagem máxima de 800 V, amperagem máxima de 10 mA e potência de 0,125 W por gel. A corrida teve a duração de 90 minutos.

Para a segunda dimensão foi utilizada eletroforese em placas de gel (*SDS-PAGE*), com sistema de tampão descontínuo, que separa as proteínas pelo seu peso molecular. Foi utilizado gel de separação com uma concentração de 12% de acrilamida. Foi utilizado o padrão proteico (Sigma Chemical) constituído de: albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (19 kDa), inibidor da tripsina (20 kDa), α -lactoalbumina (14,2 kDa) e aprotinina (6,6kDa).

2.3. Coloração das proteínas

Os géis foram imersos em uma solução a 0,15% de Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Chemical), 53% de metanol, 7% de ácido acético e água por aproximadamente 18 horas. A descoloração dos géis para evidenciação das bandas foi efetuada em uma solução de 53% de metanol, 7% de ácido acético e água, por no mínimo cinco trocas de solução por gel.

2.4. Secagem dos géis

Os géis descorados foram equilibrados por duas horas em solução de 50% de metanol, 1% de glicerol em água destilada, colocados entre duas folhas de celofane até sua completa secagem.

2.5. Obtenção e análise das imagens

Após secagem, os géis foram escaneados (Hewlet-Packard Scanjet 6100 C scanner, São Paulo, SP, Brasil) e analisados pelo programa Optiquant Acquisition & Analysis (versão 2.00, Packard Instrument, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) para determinação da densidade óptica das bandas proteicas, as quais foram expressas em *pixels*. A densidade óptica das bandas proteicas foi expressa em percentagem relativa, sendo que 100% representa o total de bandas (*pixels*) de uma área definida, constante para todos os géis, correspondendo cada banda proteica a uma percentagem do total. Através do peso molecular e do ponto isoelétrico (pI) aproximado, foi verificada a correspondência entre as bandas proteicas analisadas e as proteínas específicas do plasma seminal equino já descritas na literatura.

2.6. Análise estatística

O delineamento utilizado foi completamente ao acaso com repetições (géis), sendo considerado como fator em estudo a congelabilidade (alta e baixa) e como erro experimental os ganhões dentro da congelabilidade. Como variável dependente, foram considerados os logaritmos das percentagens relativas da densidade óptica das bandas proteicas. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com um nível de significância

de 5%. O programa estatístico utilizado foi o General Linear Model procedures (Statistical Analysis System, versão 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA).

2.7. Identificação das proteínas

As bandas contendo as proteínas de interesse foram cortadas dos géis bidimensionais e enviadas para identificação na Columbia University/Protein Chemistry Core Facility, EUA.

A identificação das proteínas de interesse foi obtida através de espectrometria de massa. As bandas dos géis foram transferidas para tubos limpos e foi adicionada água destilada para permitir a hidratação dos géis, após o celofane foi retirado através de pinças. Em seguida, os géis foram preparados para digestão, onde cada banda proteica recortada do gel, após a hidratação, era lavada por duas vezes com uma solução contendo 100 µl de Tris 0,05 M, pH 8,5 mais 30% de acetonitrila por 20 minutos sob agitação. Os géis eram novamente lavados com 100% de acetonitrila por 1-2 minutos. Posteriormente as peças de gel eram submetidas à secagem por três minutos em centrífuga concentradora tipo Speed-Vac.

Os géis foram submetidos à digestão pela adição de 0,06µg de tripsina modificada (sequencing grade, Roche Molecular Biochemicals) em 13-15 µl de Tris 0,025 M, pH 8,5. Os tubos eram incubados para bloqueio em banho maria a 32°C por 18 horas. Após o bloqueio, os peptídeos extraídos eram lavados por duas vezes com uma solução contendo 50 µl de acetonitrila 50% mais 2% de TFA; os extratos eram secos e ressuspendidos em uma solução matriz. A solução matriz foi preparada com uma solução de 10 mg/mL de ácido 4-hidroxi- α -ciano-cinâmico em 50% de acetonitrila mais 0,1% TFA e foram adicionados à solução matriz dois padrões: angiotensina e o peptídeo ACTH 7-38. Os extratos secos eram dissolvidos em 3 µl da solução matriz e 0,5 µl foi colocado sobre as amostras. Quando a banda era completamente seca, foi lavada por duas vezes com água milli-q.

A análise através da espectrometria de massa MALDI, foi realizada utilizando um espectrômetro de massa modelo Voyager DE Pro em modo linear (Applied Biosystems). A massa molecular dos peptídeos foi submetida ao programa NCBI. Os peptídeos foram colocados em Banco de Dados de Sequência de Proteína NCBI e ou GenPept para identificação da proteína. Os programas usados foram ProFound <http://129.85.19.192/profound-bin/WebProFound.exe> e MS-Fit <http://prospector.ucfs.edu>.

3. Resultados

A distribuição das proteínas do plasma seminal equino é apresentada na Fig. 1. Foram observadas 25 bandas proteicas nos géis. Entretanto, somente seis ejaculados (dois de garanhões de baixa e quatro de alta congelabilidade do sêmen, respectivamente), continham todas as 25 bandas proteicas. Não foram detectadas diferenças significativas para cada banda proteica nas amostras de um mesmo garanhão. Entretanto, seis ejaculados (dois e quatro, de garanhões de alta e baixa congelabilidade, respectivamente) não apresentaram todas as proteínas.

Das 25 proteínas encontradas neste estudo, cinco bandas não estavam presentes nas amostras dos garanhões de baixa congelabilidade: **13** (25-27 kDa), **17** (26-27 kDa), **29** (14-15 kDa), **43** (11-13 kDa) e **45** (18,2 kDa). Apenas a banda **13** (25-27 kDa) não estava presente nas amostras de plasma seminal de um reprodutor do grupo de alta congelabilidade do sêmen. O peso molecular, o ponto isoelétrico, a densidade óptica média e o desvio padrão dos 25 polipeptídios estão apresentados na Tabela 2.

Seis das proteínas encontradas neste estudo apresentaram diferença quantitativa entre as amostras dos ejaculados dos reprodutores pertencentes ao grupo de alta congelabilidade, daquelas provenientes dos reprodutores de baixa congelabilidade do sêmen: as bandas **5** (80-85 kDa, pI 7,54), **7** (75 kDa, pI 8,32), **15** (26,7 kDa, pI 5,51), **25** (25 kDa, pI 7,54), **35** (13,9 kDa, pI 8,14) e **45** (18,2 kDa, pI 5,0-5,2). A densidade óptica desses polipeptídios encontra-se expressa na Tabela 3. A banda **45** estava ausente nas amostras de plasma seminal de apenas um garanhão do grupo de baixa congelabilidade do sêmen. As demais bandas proteicas encontradas neste estudo não apresentaram densidades ópticas com diferenças significativas quanto às amostras dos reprodutores. Duas proteínas apresentaram densidade óptica superior nas amostras de plasma seminal dos reprodutores de alta congelabilidade do sêmen: a banda **5** (80-85 kDa, pI 7,54) identificada como CRISP-3 e a banda, **45** (18,2 kDa, pI 5,0-5,2) identificada como HSP-2. Contrariamente às bandas proteicas anteriormente mencionadas, as proteínas representadas pelas bandas: **7** (75 kDa, pI 8,32) identificada como lactoferrina, **15** (26,7 kDa, pI 5,51) identificada como calicreína, **25** (25 kDa, pI 7,54) identificada como CRISP-3, **35** (13,9 kDa, pI 8,14) identificada como HSP-1 apresentaram densidade óptica superior nas amostras de plasma seminal dos reprodutores de baixa congelabilidade do sêmen. (Figura1).

4. Discussão

Vinte e cinco bandas com densidade óptica variável, pesos moleculares entre 10 e 85 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 3,2 a 7,54 foram detectadas nos géis após secagem, mas nenhuma dessas bandas apresentou variação significativa na frequência entre as amostras dos garanhões utilizados no experimento.

A proteína representada pela banda **5**, com peso molecular de 80 a 85 kDa e pI 7,54 foi identificada como CRISP-3. Esta proteína apresentou densidade óptica superior nas amostras de garanhões de alta congelabilidade de sêmen, enquanto a banda proteica **25** (25 kDa, pI 7,54) apresentou densidade óptica superior nas amostras do grupo de baixa congelabilidade.

A proteína rica em cisteína-3 (CRISP-3) está presente em grandes quantidades no plasma seminal de garanhões. Essa proteína é expressa no epidídimo e através de todo o trato reprodutivo do equino, com maior expressão na ampola [7]. Com base na grande expressão da CRISP-3, conclui-se que ela pode apresentar um importante papel na reprodução equina. A CRISP-3 parece contribuir nas funções do plasma seminal no trato reprodutivo feminino, apesar do papel desta proteína no processo de fertilização de equinos ainda necessitar de maiores investigações [1]. O padrão de expressão do gene da CRISP-3 foi confirmado através de estudos de acompanhamento nos níveis proteicos que detectaram proteínas com sutis diferenças de peso molecular ao longo do trato reprodutivo masculino do equino [1], o que concorda com o presente resultado.

Hamann et al. [23] identificaram 52 novos sítios de polimorfismo da CRISP-3 em garanhões da raça Hanoveriana. Existem algumas principais diferenças entre genótipos para CRISP-3 c.+622G>A de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), que resulta em uma troca de aminoácido de glutamina para lisina na posição 208 da proteína CRISP-3. Possivelmente uma troca não conservativa de ácido glutâmico para lisina nessa região da CRISP-3 pode induzir a alteração de suas propriedades de ligação proteína-proteína, podendo subsequentemente afetar a fertilidade do macho. É possível supor que o polimorfismo entre os genes CRISP-3 no equino pode afetar a função da proteína.

A banda proteica **7** (75,4 kDa, pI 6,9-7,4) foi identificada como lactoferrina, uma proteína de ligação ao ferro com massa molecular de 80 kDa [24,25]. A função fisiológica da lactoferrina seminal ainda permanece indefinida. É uma proteína secretada no epidídimo, mas não no testículo ou vasos deferentes do equino [26]. A

transferrina, proteína homologa a lactoferrina do leite [25], é a principal proteína sérica de ligação ao ferro e também está presente no plasma seminal, com sua origem nas células de Sertoli [27, 28]. Buckett et al. [28], reportaram concentração aumentada de lactoferrina em amostras de sêmen apresentando oligospermia e oligoastenospemia quando comparadas a amostras normospérmicas em humanos. Em humanos e touros, níveis alterados de transferrina no plasma seminal têm sido associados a disfunções testiculares e reduzida fertilidade [30]. Considerando o aumento de sua concentração nas amostras de sêmen de humanos com oligospermia e astenospermia e a presença da lactoferrina quantitativamente superior no plasma seminal de garanhões de baixa congelabilidade do sêmen encontradas neste estudo, as funções biológicas desta proteína no equino aparentam ser similares àquelas reportadas em humanos.

A proteína representada na banda **35**, com peso molecular de 13,9 kDa e pI 3,8-4,2 foi identificada como HSP-1, enquanto a proteína **45** com peso molecular de 18,2 kDa e pI 5,0-5,2 foi identificada como HSP-2. HSP-1 (banda **35**) apresentou densidade óptica superior nas amostras de garanhões do grupo de baixa congelabilidade do sêmen. Contrariamente, a banda **45** (HSP-2) apresentou densidade óptica superior nas amostras de reprodutores de alta congelabilidade. As proteínas do plasma seminal equino 1 e 2 (HSP-1 e HSP-2), são duas proteínas homólogas as BSP do plasma seminal bovino. Foram purificadas e possuem propriedades de ligação com a fosforilcolina, a heparina e a gelatina [6, 30]. Todos os membros desta família de proteínas possuem um domínio tipo II, que parece ser responsável por estas propriedades de ligação e suas estruturas primárias apresentam de 50% a 65% de semelhança na sequência [6, 31-34].

A presença da proteína do plasma seminal do equino (HSP-2), com densidade óptica superior nas amostras dos garanhões de alta congelabilidade do sêmen, concorda com os achados de Jobim et al. [11], em bovinos, que encontraram uma banda proteica com peso molecular de 15 a 16 kDa, pI 4,7 a 5,2, com densidade óptica superior nas amostras de plasma seminal de touros de alta congelabilidade. Posteriormente essa proteína foi imunoidentificada como a proteína do plasma seminal de bovinos (BSP) A1/A2 [36]. As proteínas BSP A1/A2 conferem uma maior proteção das propriedades da membrana espermática durante o processo da congelação do sêmen [11]. Recentemente, Manjuntah et al. [12] relataram que a gema do ovo e a caseína do leite, que são amplamente utilizadas para a preservação do sêmen [10], protegem a função espermática através da prevenção da ligação das principais proteínas do plasma seminal bovino (BSP) ao espermatozoide, impedindo desta forma, a estimulação da perda

lipídica da membrana espermática mediada por estas proteínas. Esta interação aparentemente impede o efeito deletério das BSP sobre a membrana espermática. Semelhante com o que ocorre com a gema do ovo, o leite desnatado impede a ligação das BSP ao espermatozoide, reduzindo a perda lipídica, mantendo a motilidade espermática e a viabilidade durante o armazenamento. Enquanto a proteção espermática pela gema do ovo envolve o sequestro das BSP pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) presentes na gema, isto é, interação BSP-lipoproteína, a proteção fornecida pelo leite desnatado não envolve a participação de lipídeos ou lipoproteínas; ao contrário, as micelas de caseína presentes no leite desnatado sequestram as BSPs. Desta forma, a proteção espermática pelo leite desnatado envolve uma interação BSP-micela de caseína (proteína-proteína) [10]. Talvez a grande quantidade de proteínas HSP-2 detectada nas amostras de plasma seminal dos garanhões do grupo de alta congelabilidade do sêmen apresente o mesmo efeito das BSP A1/A2 acima mencionadas.

Enquanto a proteína HSP-2 detectada neste estudo, apresentou densidade óptica superior nos garanhões de alta congelabilidade de sêmen, a HSP-1 apresentou-se quantitativamente superior naquelas amostras dos garanhões de baixa congelabilidade. As duas proteínas são membros da mesma família, entretanto a HSP-1 possui um grau diferente de glicosilação. Calvete et al. [6] reportaram que um grau maior ou menor de glicosilação da HSP-1 tem influência sobre a ligação com a heparina e esta propriedade pode influenciar outras funções da proteína.

A banda proteica **15** (26,7 kDa, pI 5,51), que apresentou densidade óptica superior nas amostras dos garanhões pertencentes ao grupo de baixa congelabilidade, foi identificada como caliceína1. A caliceína específica prostática é membro da família do gene da serina-protease, que foi inicialmente descoberta no sêmen e considerado como marcador sérico de maior utilidade para o diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata [37]. As serina-proteases purificadas do plasma seminal equino possuem uma extensa sequência de homologia com o antígeno prostático específico (PSA) em humanos [38]. A caliceína secretada pela próstata do equino (HPK) aparentemente representa a contraparte equina do PSA humano. A HPK foi purificada de garanhão reprodutivamente ativo e foi reportado que o nível de expressão do mRNA do PSA aumenta com andrógenos [38]. A sequência de aminoácidos da caliceína tem alto nível de similaridade (58 a 60%) com o PSA humano, o PSA do macaco-rhesus e com a caliceína prostática humana (hK2) [38].

A calicreína 1 (KLK1), componente chave do sistema calicreína-quinina, é originária de um *locus* do braço longo do cromossomo 19 que contém diversas serina-endopeptidases relacionadas. O papel biológico destas peptidases relacionadas à calicreína não está claro, mas evidências emergentes sugerem que elas podem ser importantes em diversos sistemas fisiológicos, por exemplo, reprodução do macho, homeostase cutânea, formação do esmalte dentário e desenvolvimento neural e plasticidade [39]. A análise filogenética também revelou a expressão gênica de uma peptidase relacionada à calicreína na próstata do equino, sendo considerada a PSA equina, sendo mais próxima da KLK1 do que da KLK3 [40]. Desta forma, a KLK3/PSA equina, não é a PSA equina, mas uma paróloga [39].

Os demais polipeptídeos analisados no plasma seminal equino, neste estudo, não apresentaram variação significativa entre as amostras do plasma seminal dos garanhões de alta e baixa congelabilidade do sêmen. Entretanto, os resultados obtidos devem ser interpretados com cuidado, pois proteínas de ligação a membrana não foram analisadas, e estas proteínas que poderiam ter sido influenciadas pela concentração espermática, não foram consideradas neste estudo.

Em conclusão, existem diferenças no perfil proteico do plasma seminal de garanhões de alta e baixa congelabilidade do sêmen. Além disso, a CRISP3 e a HSP-2 são potenciais marcadores de alta congelabilidade de sêmen de garanhões.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Haras Estatal da Baixa Saxônia, Celle, Alemanha, pelo fornecimento das amostras de plasma seminal.

Referências

- [1] Töpfer-Petersen E, Mahnaz Ekhlesi-Hundrieser, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. *Animal Reproduction Science* 2005;89:159–170.
- [2] Amann RP, Cristanelli MJ, Squires E L. Proteins in stallion seminal plasma. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1985;35:113-120.
- [3] Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayer-Hosken RA. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 1999;52:863–73.

- [4] Calvete JJ, Nessau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E, Töpfer-Petersen E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. *Reprod. Domest Anim* 1994;29:411–426.
- [5] Ekhlesi-Hundrieser M, Schafer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, Töpfer-Petersen E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol Reprod Dev* 2005;70:45–57.
- [6] Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Töpfer-Petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995;310:615-622.
- [7] Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Töpfer-Petersen, E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1387:206–216.
- [8] Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem* 1996;242:636-640.
- [9] Roncoletta M, Morani ESC, Franceschini PH, Ramos PRR. Caracterização da proteína 26 kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. *Arq Fac Vet UFRGS* 2000;28:323.
- [10] Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol Reprod.* 2007;77(1):120-126.
- [11] Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 2004;61:255-266.
- [12] Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Spermatology* 2007;65:217-228.
- [13] Barrios, B, Perez R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez J A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod* 2000;63,(5):1531-1537.
- [14] Rebolledo AD, Sierra LN, Tamayo AC, Loria AA, Denis SE, Oses RB, Parra EG, Monsreal LP, Ugalde JR. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Rev Cient-Fac Cien Veter* 2007;17:73–76.

- [15] Hiron M, Harshan LP, Singh A, Arangasamy MR, Ansari Kumar S. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2006;93:124-133.
- [16] Asadpour R, Alavi-Shoushtari SM, Asri Rezaii S, Ansari MHK. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Anim Reprod Sci* 2007;102:308-313.
- [17] Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology* 2009;72(7):930-948.
- [18] Martin JC, Klug E, Günzel AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fertil* 1979; Suppl.27:45–51.
- [19] Lowry OH, Rosebrough WJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265–75.
- [20] O’Farrel PZ, Goodman HM, O’Farrel PH. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 1977;12:1133– 42.
- [21] Rodnight R, Zamani R, Tweedale A. An investigation of experimental conditions for studying phosphorylation in microslices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. *J Neurosci Methods* 1988;24:27–38.
- [22] Lenz G, Manozzo L, Gottardo S, Achaval M, Salbego C, Rodnight R. Temporal profiles of the in vitro phosphorylation rate and immunocontent of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) after kainic acid induced lesions in area CA1 of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. *Brain Res* 1997;764:188 –96.
- [23] Hamann H, Jude R, Sieme H, Mertens U, Töpfer-Petersen E, Distl O, et al. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim Genet* 2007;38:259–64.
- [24] Aisen P, Leibman A. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochim Biophys Acta* 1972;257:314 –23.
- [25] Baldwin GS. Comparison of transferrin sequences from different species. *Comp Biochem Physiol B* 1993;106:203–18.
- [26] Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux J. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 2000;62:1790 –1803.

- [27] Gilmont RR, Senger PL, Sylvester SR, Griswold MD. Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. *Biol Reprod* 1990;43:151–7.
- [28] Holmes SD, Lipshultz LI, Smith RG. Transferrin and gonadal dysfunction in man. *Fertil Steril* 1982;38:600–4.
- [29] Buckett WM, Luckas MJ, Gazvani MR, Aird IA, Lewis-Jones DI. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. *J Androl* 1997;18:302–4.
- [30] Zalata A, Hafez T, Schoonjans F, Comhaire F. The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 1996;11:761–4.
- [31] Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 1997; 407:201–6.
- [32] Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acid proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 3:685–92.
- [33] Seidah NG, Manjunath P, Rochemont TJ, Sairam MR, Chretien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma homology to PDC-109 and to the collagenbinding domain of fibronectin. *Biochem J* 1987;243:195–203.
- [34] Salois D, Ménard M, Paquette Y, Manjunath P. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod* 1999;61:288–97.
- [35] Mattos RC, Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Wald VB, Horn AP, et al. BSP A1/A2: A seminal plasma marker of high semen freezability [abstract]. 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil 2004;2:462.
- [36] Barry MJ. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med* 2001;344:1373–7.
- [37] Carvalho AL, Sanz L, Baretino D, Romero A, Calvete JJ, Romão MJ. Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: a homologue of human PSA. *J Mol Biol* 2002;322:325–37.
- [38] Henttu P, Vihko P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. *Ann Med* 1994;26:157–64.

[39] Lundwall A, Brattsand M. Kallikrein-related peptidases. *Rev Cell Mol Life Sci* 2008;65:2019–38.

[40] Olsson AY, Lilja H, Lundwall A. Taxon-specific evolution of glandular kallikrein genes and identification of a progenitor of prostate-specific antigen. *Genomics* 2004;84:147–56

Tabela 2. Peso molecular, ponto isoelétrico e média e desvio padrão da densidade óptica dos polipeptídios do plasma seminal dos dez garanhões.

Proteína	PM (kDa)	pI	Densidade óptica (média e DP)
3	80-85	7,2 – 7,5	0,046 ± 0,010
5	80-85	7,54	0,039 ± 0,010
7	75,4	6,9 – 7,4	0,449 ± 0,088
9	65-70	5,0 – 5,5	0,162 ± 0,031
11	27-29	4,8 – 5,0	0,137 ± 0,049
13	25-27	4,9 – 5,2	0,092 ± 0,057
15	26,7	5,51	0,166 ± 0,039
17	26-27	5,0 – 5,3	0,058 ± 0,021
19	25-26	5,0 – 5,5	0,146 ± 0,037
21	25-26	5,6 – 5,8	0,059 ± 0,014
23	25-26	7,3 – 7,5	0,163 ± 0,050
25	25	7,54	0,245 ± 0,095
27	14-15	5,0 – 5,3	0,246 ± 0,023
29	14-15	4,4 – 4,6	0,173 ± 0,011
31	14-15	4,2 – 4,4	0,062 ± 0,015
33	12-14	3,9 – 4,2	0,383 ± 0,101
35	13,9	3,8 – 4,2	0,144 ± 0,037
37	13-14	3,4 – 3,7	0,195 ± 0,031
39	11-13	4,2 – 4,3	0,090 ± 0,013
41	12-13	3,4 – 3,6	0,064 ± 0,016
43	11-13	3,2 – 3,6	0,188 ± 0,026
45	18,2	5,0 – 5,2	0,098 ± 0,014
47	10-12	5,0 – 5,5	0,264 ± 0,067
49	10-12	5,8 – 6,2	0,184 ± 0,053
51	10-11	6,4 – 6,8	0,115 ± 0,032

Tabela 3. Média e desvio padrão da densidade óptica dos polipeptídeos do plasma seminal equino que apresentaram diferença quanto à congelabilidade do sêmen.

Congelabilidade	Bandas Proteicas					
	5	7	15	25	35	45
Baixa	0,036 ^b ± 0,010	0,479 ^a ± 0,053	0,178 ^a ± 0,031	0,279 ^a ± 0,076	0,155 ^a ± 0,035	0,092 ^b ± 0,005
Alta	0,042 ^a ± 0,011	0,420 ^b ± 0,105	0,154 ^b ± 0,03	0,214 ^b ± 0,102	0,134 ^b ± 0,037	0,103 ^a ± 0,018

a,b - Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (P<0,05).

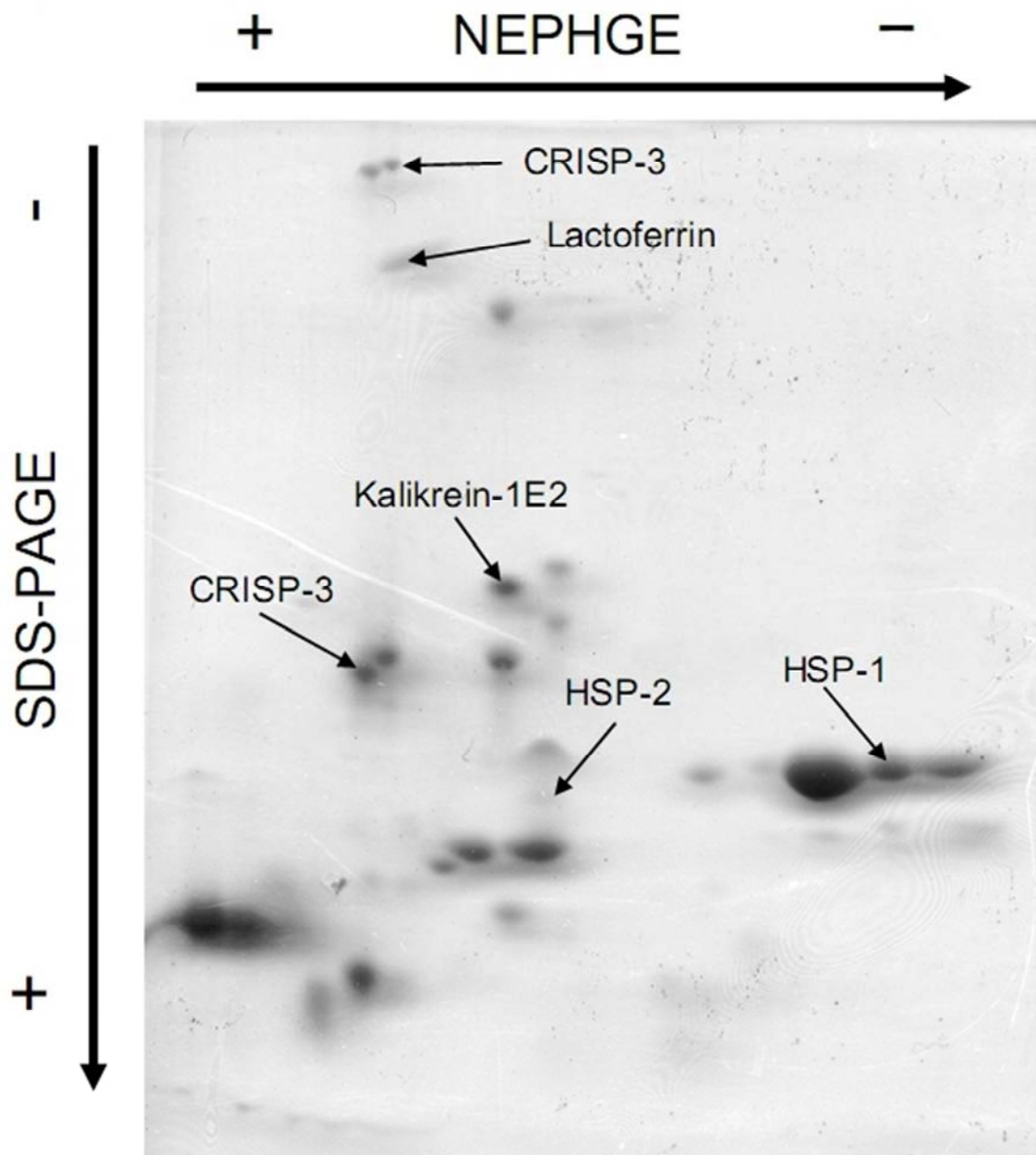


Figura 1. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida das proteínas do plasma seminal equino, corado com Coomassie blue. A seta superior mostra a direção do gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE) da terminação alcalina (+) para a ácida (-) na primeira dimensão. A seta na esquerda demonstra a direção do peso molecular. As demais setas indicam as proteínas no plasma seminal equino que apresentaram diferença na congelabilidade do sêmen.

4 CONCLUSÕES

Existem diferenças no perfil proteico do plasma seminal dos garanhões de alta e baixa congelabilidade do sêmen.

A CRISP3 (80-85 kDa, pI 7,54) e a proteína HSP2 (18,2 kDa, pI 5,0-5,2), são proteínas do plasma seminal equino relacionadas com a alta congelabilidade do sêmen; assim, podem ser indicadas como marcadores.

Indicam-se as proteínas lactoferrina (75,4 kDa, pI 6,9-7,4), calicreína (26,7 kDa, pI 5,51), CRISP3 (25 kDa, pI 7,54) e a HSP1 (13,9 kDa, pI 3,8-4,2) como indicativo da baixa congelabilidade do sêmen equino.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este estudo foi pioneiro em relacionar as proteínas do plasma seminal equino com a congelabilidade do sêmen, através da eletroforese bidimensional. Estudos relacionando as proteínas do plasma seminal equino com a congelabilidade do sêmen estão sendo dirigidos em diversos centros de pesquisa em todo o mundo. Os resultados obtidos poderão direcionar futuras pesquisas, como o estudo destas proteínas no plasma sanguíneo e o desenvolvimento de testes diagnósticos práticos para a identificação precoce de reprodutores de alta congelabilidade do sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERSOLD, R.; ANDERSON, L.; CAPRIOLI, R.; DRUKER, B.; HARTWELL, L.; SMITH, R. Perspective: a program to improve protein biomarker discovery for cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p.1104-1109, 2005.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.

AISEN, P.; LEIBMAN, A. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 257, n. 2, p. 314-323; 1972.

AKCAY, E.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 53, n. 9, p. 481-485, 2006.

ALLISON, A. C.; HARTREE, E. F. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 21, p. 501-515, 1970.

ALVARENGA, M.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. The effect of breed and spermatoc parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUM ON STALLION SEMEN, 1996, Amersfoort. **Proceedings...**

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia. Lea & Febiger, 1137p., cap. 80, p. 715-745, 1992.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

ASADPOUR R, ALAVI-SHOUSHTARI SM, ASRI REZAI S, ANSARI MHK. SDS364 polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 308-313,. 2007.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.

AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-798, 1996.

AURICH, J.E., KÜHNE, A., HOPPE, H., AURICH, C. Effects of seminal plasma on stallion semen quality after cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, Abstract Series, v. 15, p. 34, 1998.

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

AZEREDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE K. T. Use of fluorescent probes in the evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. In: 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2000, **Proceedings**, Stockholm 2, p. 136. 2000.

BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74, p. 45-51, 1994.

BALDWIN, G.S. Comparison of transferrin sequences from different species. Review. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**; v. 106, n. 1, p. 203-218, 1993.

BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; WESSEL, M. T.; SABEUR, K. Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility, **Theriogenology**, v. 59, p. 901–914, 2003.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p.1061-1069, 2001.

BARBACINI, S.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G. Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994–1997 period. **Equine Veterinary Education**, v. 11, p.109-112, 1999.

BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 21, p. 47-51, 1957.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. **Journal of Andrology**, 26; p. 539-549. 2005.

BARRIOS, B.; PEREZ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of. Reproduction**, v. 63, n. 5, p.1531-1537, 2000.

BARRY, M. J. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p.1373–1377, 2001.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. Fertility range of beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v. 72 , p 2441-2448, 1994.

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

BENNET, J. P. Microeletrophoresis of bull, ram, boar & rabbit seminal plasma proteins. In: CONGRESSO INTERNAZIONALE PER LA RIPRODUZIONE ANIMALE E LA FECONDAZIONE ARTIFICIALE, 4., 1965, **Proceedings**, Trento: [s.n.], p.186-189, 1965.

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, n.1, 120-126, 2007.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE C.; MANJUNATH, P.; Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 461-470. 2005.

BERGQUIST, J.; HAKANSSON, P.; SUNDQVIST, B.; ZUBAREV, R. Mass spectrometry of proteins - Uppsala perspectives on past and present. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 268, p. 73-82, 2007.

BLOBEL, C. P. Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 75-83, 2000.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A. et al. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p.75-88, 2001.

BOISVERT, M.; BERGERON, A.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 656-661. 2004

BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, n.5, p.863-873, 1999.

BUCKETT, W. M.; LUCKAS, M. J.; GAZVANI, M. R.; AIRD, I. A.; LEWIS-JONES, D. I. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. **Journal of Andrology**, v.18, n. 3, p.302-304, 1997.

BUSSO, D.; COHEN, D. J.; DA ROS, V.; FISSORE, R.; CUASNICU, P. S. Studies on the participation of epididymal sperm protein DE/CRISP-1 in egg activation, **Cellular Molecular Biology**, (Noisy-le-grand), v. 49,p. 407–412, 2003.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; RAIDA, M.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modification, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 365, p. 179-182, 1995c.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemistry Journal**, v. 310, p. 615-622, 1995b.

CALVETE, J. J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 407, p. 201-206. 1997a.

CAMEO, M. S.; BLAQUIER, J.A.; Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis, **Journal of Endocrinology**, v. 69, p. 47–55, 1976.

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

CARVALHO, A. L.; SANZ, L.; BARETTINO, D.; ROMERO, A.; CALVETE, J. J.; ROMÃO, M. J.; Crystal Structure of a Prostate Kallikrein Isolated from Stallion Seminal Plasma: A Homologue of Human PSA. **Journal of Molecular Biology**, n. 322, p. 325-337, 2002.

CARVER, D. A.; BALL, B.A.; Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C, **Theriogenology**, v. 58, p. 1587–1595, 2002.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 930-948, 2009.

CELIS, J. E.; GROMOV, P. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 16-21, 1999.

CENTURIÓN, F.; VAZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARRILLA, I.; GARCIA, E.; MARTINEZ, E. A. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 640-646, 2003.

CEPEA-CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil**. Piracicaba, Esalq/USP, 2006, 68p.

CHAMPION, Z. J.; M.H. VICKERS, C.G. GRAVANCE, B.H. BREIER AND P.J. CASEY, Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro. **Theriogenology**, v. 57, p. 1793–1800, 2002.

CHOE, L. H.; WERNER, B. G.; LEE, K. H. Two-dimensional protein electrophoresis: from molecular pathway discovery to biomarker discovery in neurological disorders. **The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 3, p. 327-335, 2006.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelamento e avaliação do sêmen equino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 14-25, 2002.

CUASNICU, P. S.; ELLERMAN, D.A.; COHEN, D.J.; BUSSO, D.; MORGENFELD, M. M.; DA ROS, V.G. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 614–618, 2001.

DA ROS V.G.; MUNUCE, M. J.; COHEN, D. J.; MARIN-BRIGGILER, C. I.; BUSSO, D.; VISCONTI, P. E.; CUASNICU, P.S. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1325–1332, 2004.

DACHEUX, J. L.; CASTELLA, S.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 319-341, 2005.

DE LEEUW, F. E.; CHEN, H. C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, n. 2, p. 171-183, 1990.

DE VITA, B. Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelamento na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen equino. 2008. 95f. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10149-55, 1992.

DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 425-435, 1994.

DIAS, A. J.; MAIA, S.; RETAMAL, C. A.; LOPEZ, M. L. Identification and partial characterization of alpha-1,4-glucosidase activity in equine epididymal fluid. **Theriogenology**, v. 61, p. 1545–1558, 2004.

EDDY, E. M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press,. cap.2, p. 27-68, 1988.

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

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SINOWATZ, F.; DE WILKE, I. G.; WABERSKI, D.; TÖPFER-PETERSEN, E. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 32-41, 2002.

ELLERMAN, D. A.; DA ROS, V. G.; COHEN, D. J.; BUSO, D.; MORGENFELD, M. M.; CUASNICU, P. S. Expression and structure-function analysis of DE, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1225–1231, 2002.

ENGLAND, G. C. W.; ALLEN, W. E.; Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v. 37, p. 373–381. 1992.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.J.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v. 27, p. 247-268, 1990.

FIOL DE CUNEO, M.; VINCENTI, L. M.; MARTINI, A. C.; PONCE, A. A.; RUIZ, R. D. Effects of PDC-109 on bovine sperm functional activity in presence or absence of heparin. **Theriogenology**, v. 62, p. 207-216, 2004.

FLOWERS, W. L. Boar fertility and artificial insemination . In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15, 1998, **Proceedings...** Birmingham, [s.n.], p. 45-52, 1998.

FOUCHECOURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.1790-1803, 2000.

FOURNIER-DELPECH, S.; THIBAULT, C. Acquisition of sperm fertilizing ability. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), **Reproduction in Mammals and Man**. Ellipses, Paris, p. 257–278, 1993.

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

FRASER, L. R.; ADEOYA-OSIGUWA, S.; BAXENDALE, R. W.; MEDEDOVIC, S.; OSIGUWA, O. O. First messenger regulation of mammalian sperm functions via adenylyl cyclase/cAMP. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 37-46, 2005.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 46, p. 1389-1402, 1996.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M.; BROOKS, C. L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-milliliter straws. **Theriogenology**, v. 46, p. 1103-1115, 1996.

FREI, B.; STOCKER, R.; ENGLAND, L.; AMES, B. N. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 264, p. 155-163, 1990.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. **Reprodução Animal**, 6 ed. São Paulo: Manole, cap.7, p. 167-190, 1995.

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

GATTI, J. L.; DRUART, X.; GUERIN, Y.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. A 105 to 94 kDa protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are source of this ACE. **Biology of Reproduction**, v 60, p. 937-945, 1999.

GIESE, A.; JUDE R.; KUIPER, H.; PIUMI, F.; SCHAMBONY, A.; GUERIN, G.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Molecular characterization of the equine AEG1 locus. **Gene**, v. 292, p. 65–72. 2002a.

GIESE, A.; JUDE, R.; KUIPER, H.; RAUDSEPP, T.; PIUMI, F.; SCHAMBONY, A.; GUERIN, G.; CHOWDHARY, B. P.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Gene**, v. 299, p. 101–109, 2002b.

GILMONT, R. R.; SENGER, P. L.; SYLVESTER, S. R.; GRISWOLD, M. D. Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 1, p. 151-157, 1990.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p.131-147, 1996.

GROSSERT, J. S. A retrospective view of mass spectrometry and natural products – sixty years of progress, with a focus on contributions by R. Graham Cooks. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 212, p. 65-79, 2001.

HAMANN, H.; JUDE, R.; SIEME H, MERTENS U, TÖPFER-PETERSEN E, DISTL O, LEEB T. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. **Animal Genetics**, v. 38, n.3, p.259-264, 2007.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.

HARRISON, R. A. P. Aspects of the enzymology of mammalian spermatozoa. In: Duckett JG and Racey PA (eds). The biology of the male gamete. **Biological Journal of the Linnean Society**, [Suppl 1] 7; p. 301, 1975.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.199-204, 1996.

HENTTU, P.; VIHKO, P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. **Annals of Medicine**, v. 26, p. 157–164, 1994.

HIRON, M.; HARSHAN, L. P.; SINGH, A.; ARANGASAMY, M. R.; ANSARI KUMAR, S. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p.124-133, 2006.

HOLMES, S. D.; LIPSHULTZ, L. I.; SMITH, R.G. Transferrin and gonadal dysfunction in man. **Fertility and Sterility**, v. 38, n. 5, p. 600-604, 1982.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-2, p. 3-22, 2000.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **Journal of Experimental Zoology**, v. 230, n. 3, p. 473-483, 1984.

HOSHIBA, H.; SINOWATZ, F. Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 27, n. 5, p. 351-353, 1998.

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, k. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 64, p. 75–77, 2002.

JALKANEN, J.; HUHTANIEMI, I.; POUTANEN, M., Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 1268–1274, 2005.

JOBIM, M. I. M. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino. 2001. 156f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2001.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v. 61, p. 255-266, 2004.

JONSSON, M.; LINSE, S.; FROHM, B.; LUNDWALL A.; MALM, J. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. **Biochemistry Journal**, v. 387, p. 447–453, 2005.

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

KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 41, n. 1, p. 33-38, 2006.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217-1227, 1997.

KATILA, T., REILAS, T., GÜVENC, K., ALM, K., ANDERSSON, M. The effect of seminal plasma on motility characteristics and viability of spermatozoa after cooled storage. In: Muller, J., Wade, J.F. (Eds.), **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v. 13, p. 3–5, 2004.

KEITH, S. L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa.. 104f. **Tese** – Colorado State University, Fort Collins, 1998.

KIKUCHI, M.; MIZOROKI, S.; KUBO, T.; OHIWA, Y.; KUBOTA, M.; YAMADA, N.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v 65, p. 679–684, 2003.

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

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel Approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KNUEPPEL, M.; OTTENSMEIER, A.; STÄHR, B. Effect of boar seminal plasma as an additive to semen extender on sperm motility in vitro and fertility in vivo. In: IV. INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 2000, Maryland, **Proceedings...** Beltsville, Maryland, USA, p. 247-248, 2000.

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

KOPF, G. S.; WOOLKALIS, M. J.; GERTON, G. L. Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet-activating protein-catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 7327-7331, 1986.

LACKEY, B. R.; GRAY S.L.; HENRICKS, D.M. Measurement of leptin and insulin-like growth factor-I in seminal plasma from different species, **Physiological Research**, v. 51, p. 309–311, 2002.

LARSON, B. L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretics studies. **Journal of Biological Chemistry**, v.206, n.2, p.741-749, 1954.

LENZ, G.; MANOZZO, L.; GOTTARDO, S.; ACHAVAL, M.; SALBEGO, C.; RODNIGHT, R. Temporal profiles of the in vitro phosphorylation rate and immunocontent of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) after kainic acid induced lesions in area CA₁ of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. **Brain Research**, v. 764, n. 1-2, p. 188-196, 1997.

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

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

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 119–128, 2008.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 191-200, 2001.

LOOMIS, P.R; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, W. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUNDWALL, A.; BRATTSAND, M. Kallikrein-related peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences Review**. v.65, p. 2019–2038, 2008.

MAEDA, T.; NISHIDA, J.; NAKANISHI, Y. Expression pattern, subcellular localization and structure-function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. **Development, Growth & Differentiation**, v. 41; p. 715-722, 1999.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S.; ESMERALDINO, A. T.; NEVES, A. P.; GARBADE, P.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 74-78, 2008.

MALSCHITZKY, E; FIALA, S.M.; ESMERALDINO, A.M.T; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C.. Perfil protéico da secreção uterina de éguas no primeiro e em diestro subsequentes da temporada reprodutiva. In: MALSCHITZKY, E. Artigo 3. Avaliação do perfil protéico da secreção endometrial da égua. 2007, 131 f. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária - UFRGS, 2007b.

MALSCHITZKY, E; FIALA, S.M.; JOBIM, M.I.M.; ESMERALDINO, A.M.T; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C Avaliação do perfil protéico da secreção endometrial pura da égua através da eletroforese bi-dimensional: Efeito do ciclo. In: MALSCHITZKY, E. Artigo 1. Avaliação do perfil protéico da secreção endometrial da égua. 2007, 131 f. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária - UFRGS, 2007a.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Spermatology**, v. 65, p.217-228, 2007.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; BAILLARGEON, L.; ROBERTS, K. D. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p.75-81, 1993a.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major Proteins of Bovine Seminal Vesicles Bind to Spermatozoa, **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 27-37, 1993.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 27-37, 1994.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemical Journal**, v. 241; p. 685-692, 1987.

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

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. General features of the seminal plasma. In: MANN & LUTWAK-MANN, **Male Reproductive Function and Semen**, 2 ed. Berlin: Springer-Verlang, p.28-34, 1981.

MATTOS, R. C.; JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G. WALD, V.B.; HORN, A. P.; MATTOS, A. L. G. BSP A1/A2: A seminal plasma marker of high semen freezability. 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2004. **Proceedings...** Porto Seguro, Brazil, v. 2, p. 462, 2004.

MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353–1362, 1999.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1165–1178, 1997.

MAXWELL, W.M.C.; LONG, C. R.; JOHNSON, L. A.; DOBRINSKY, J. R.; WELCH, G. R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, p. 433–440, 1998.

MCCAULEY, T. C.; BELLIN, M. E.; AX, R. L. Localization of a heparin binding protein to distinct regions of bovine sperm. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 2, p. 336-341, 1996.

MEDEIROS, A. S. L.; FERREIRA, H. N.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Índices de fertilidade de espermatozoides de garanhões submetidos ao estresse osmótico por diferentes crioprotetores. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1006, 2007.

MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G. M.; CARMO, M. T. C.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 273-276, 2002.

MENARD, M.; NAUC, V.; LAZURE, C.; VAILLANCOURT, D.; MANJUNATH, P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, p. 349–357, 2003.

METCALF, L. Maximizing reproductive efficiency in private practice; the management of mares and the use of cryopreserved semen. In: Proceedings of the Annual Meeting Society for Theriogenology, p. 155–159, 1995.

MIKLOS, G. L.; MALESZKA, R. Protein functions and biological contexts. **Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 169-178, 2001.

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

MOREAU, R.; THÉRIEN, I.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Type II domains of BSP-A1/A2 proteins: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 148-154, 1998.

MORTARINO, M.; TEDESCHI, G.; NEGRI, A.; CECILIANI, F.; GOTTARDI, L.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 797-801, 1998.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, 2007.

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

MOURA, A. A.; SOUZA, C. E.; STANLEY B. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics** v. 73, p. 2006-2020, 2010.

MÜLLER, P.; ERLEMANN, K. R.; MULLER, K.; CALVETE, J. J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; MARIENFELD, K.; HERRMANN, A. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. **European Biophysics Journal**, v. 27, p. 33-41, 1998.

MÜLLER, Z. Practicalities of insemination of mares with deepfrozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, Suppl., p. 121-125, 1987.

MUNGAN, N. A.; MUNGAN, G.; BASAR, M. M.; BAYKAM, M.; ATAN, A. Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm mobility. **Archives of Andrology**, v. 47, n. 2, p.113-117, 2001.

NASS, S. J.; MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, n. 3, p. 237-246, 1990.

NIELSEN, J. M.; KOFOED BOCK, T. S.; ERSBOLL, A. K.; Factors associated with fertility in horses in a Danish equine practice after artificial insemination with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 336-337, 2008.

NOOIJ, F. J. M.; VAN DER SLUIJS-GELLING, A. J.; JOL-VAN DER ZIJDE, C. M.; VAN TOL, M. J. D.; HAAS, H.; RADL, J. Immunoblotting techniques for the detection of low level homogeneous immunoglobulin components in serum. **Journal of Immunological Methods**, v. 134, p. 273-281, 1990.

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

O'FARREL, P. Z.; GOODMAN, H. M.; O'FARREL, P. H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, v. 12, p. 1133-1142, 1977.

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

OLSON, G. E.; WINFREY, V. P.; GARBERS, D. L.; NOLAND, T. D. Isolation and characterization of a macromolecular complex associated with the auter acrosomal membrane of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 761-779, 1985.

OLSSON, AY, LILJA H, AND LUNDWALL A. Taxonspecific evolution of glandular kallikrein genes and identification of a progenitor of prostate-specific antigen. **Genomics**, v. 84, p. 147-156, 2004.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10, Urbana. **Proceedings...** Urbana, University of Illinois, v. 3, p. 377-379, 1984.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; CUELLO, C.; GIL, M. A.; ROCA, J.; DI BERARDINO, D.; MARTINEZ, E. A. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. **Reproduction**, v. 128; p. 615-621, 2004.

PEÑA, F. J.; SARAVIA, F.; NUÑEZ-MARTINEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 101-113, 2006.

PÉREZ-PÉ, R.; BARRIOS, B.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seasonal differences in ram seasonal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography**, v. 760, p. 113-121, 2001.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wild California, v.7, n.5, p.289-302, 1987.

POLGE, C.; ROWSON, L. E. A ; Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79°C. **Nature**, v.169, p. 626, 1952.

POSADAS, I. C. Study of seminal plasma and the spermadhesin PSP-I/PSP-II on the functionality of boar sperm, 2007. **Tese**, Universidade de Murcia, 2007.

REBOLLEDO, A D.; SIERRA, L. N.; TAMAYO, A. C.; LORIA, A. A.; DENIS, S. E.; OSES, R. B.; PARRA, E. G.; MONSREAL, L. P.; UGALDE, J. R. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. **Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias**, v. 17, p. 73–76, 2007.

REINEKE, A.; HESS, O.; SCHAMBONY, A.; PETRUNKINA, A. M.; BADER, H.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E. Sperm-associated seminal plasma proteins—a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions? **Pferdeheilkunde**, v. 6, p. 531–537, 1999.

REINERT, M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MANN, K.; TÖPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, p. 636-640, 1996.

REINERT, M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. **Andrologia**, v. 29, n. 4, p. 179-186, 1997.

REYZER, M. L.; CAPRIOLI, R. M. MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. **Current Opinions in Chemistry Biology**, v. 11, n. 1, p. 29-35, 2007.

ROBERTSON, L.; WATSON, P. F. Calcium transport in diluted or cooled ram sperm. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 77, p. 177-185, 1986.

ROCHA, M. C.; GARCIA, O. S.; FERREIRA NETO, J. M.; SCHONS, J. A. B. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus com alterações reprodutivas. **Arquivos da Escola de Veterinária UFMG**, v.26, n. 2, p.223-233, 1974.

RODNIGHT, R.; ZAMANI, R.; TWEEDALE, A. An investigation of the experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **Journal Neuroscience Methods**, v.24, p. 27-38, 1988.

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

RONCOLETTA, M. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen de touros.1999, 109f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrária e Veterinárias) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. M. H. de; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. **Arquivos da Veterinária**, v.13, n.2, p.135-140, 1997.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; FRANCESCHINI, P. H.; RAMOS, P. R. R. Caracterização da proteína 26 kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p. 323, 2000.

ROSSI, T. C.; PAPA, F. O.; SANTOS, T. B.; MACEDO, L. P.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; DELL'AQUA JR, J. A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p. 350-352, 2003.

SAALMANN, A.; MUNZ, S.; ELLERBROCK, K.; IVELL, R.; KIRCHHOFF, C. Novel spermbinding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58; p. 88-100, 2001.

SAILLING, P. M. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. IV. A monoclonal antibody prevents zona penetration by inhibition of the acrosome reaction. **Developmental Biology**, v. 117, p. 511-519, 1986.

SAILLING, P. M.; IRONS, J.; WAIBEL, R. Mouse sperm antigens that participate in fertilization, I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 515-526, 1985.

SAMPER, J.C.; HANKINS, K. Breeding mares with frozen semen in private practice. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 2001, San Diego. **Proceedings...** v. 47, p. 314-318, San Diego, 2001.

SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.44, p. 107-114, 1991.

SAMPER, J.C.; MORRIS, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, v. 49, p. 895-903, 1998.

SANZ, L.; CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; SCHMID, E. R.; AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F.; EHRHARD, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 300, p. 213-218, 1992.

SCHAMBONY, A.; GENTZEL, M.; WOLFES, H.; RAIDA, M.; NEUMANN, U.; TÖPFER-PETERSEN, E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1387, p. 206–216, 1998a.

SCHAMBONY, A.; HESS, O.; GENTZEL M.; TÖPFER-PETERSEN, E.; Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 53 supl, p. 67-72, 1998b.

SCHMITT, F.L. A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen equino a +4°C. 2002. 101f. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto alegre.

SEATON, G.J.; HALL, L.; JONES, R. Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a C-terminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. Effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1667–1676, 2000.

SIEME, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 61, p. 769–784, 2004.

SOUBEYRAND, S.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Phospholipase A2 from bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase. **Biochemistry Journal**, v. 329, 41-47, 1998.

SPUGIN, B.; MARGALIT, I; BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **Journal of Cell. Science**, v. 108, p. 2525-2535, 1995.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Bulletin n. 9, 1999.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Review. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

STRZEZEK, J.; HOPFER, E.; ZABORNIK, A. Zinc-ion dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. **Animal Reproduction Science**, v. 13, p. 133-142, 1987.

SZUMOWSKI, P. Quelques résultats de l' examen électrophorétique des protéines du plasma seminal de taureau. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 3., 1956, Cambridge. **Proceedings...** Cambridge: [s.n.], p.102-105, 1956.

TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 6175-6179, 2000.

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

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

TISCHNER, M.; Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, Suppl., p. 53-59, 1979.

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

TREIN, C.R.; Percoll® e plasma seminal na preservação do sêmen equino a +4°C, 2004. 70f. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

UDBY, L.; BJARTELL, A.; MALM, J.; EGESTEN, A.; LUNDWALL, A. K.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N.; KJELDSSEN, L. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 3, 2005.

VAN VOORST, A.; LEENSTRA, F. R. Effect of dialysis before storage or cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. **Poultry Science**, v.74, p.141-6, 1994.

VARELA, P. F.; ROMERO, A.; SANZ, L., ROMAO, M. J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, p. 635-649, 1997.

VARNER, D. D. Approaches to cryopreservation of equine semen. Current techniques for semen cryopreservation and new investigative strategies that may improve performance of cryopreserved semen from a higher percentage of stallions. In: ANNUAL MEETING OF THE ITALIAN ASSOCIATION OF EQUINE VETERINARIANS, 9, 2003, Pisa **Proceedings...**, Pisa, 2003

VESSELINOVITCH, S. D. Electrophoresis of bovine semen. Part. III. Characterization of the seminal plasma proteins. **Canadian Journal Compendium Medicine**, v. 23, n. 1, p. 10-20, 1959.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n.1-4, p.115-136, 2005.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A. M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, p. 907-919, 1997.

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

VOGLMAYR, J. K.; AMANN, R. P. Glucose metabolism and lipid synthesis of cauda epididymal and ejaculated bull spermatozoa in the presence of selected androgens. **Acta Endocrinology**, v. 73, p. 196, 1973.

WAGNER, A.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; HETTEL, C.; PETRUNKINA, A.; WABERSKI, D.; NIMTZ, M; TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation studies in the pig. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 249-257, 2002.

WATSON, P. F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessments of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 781-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61.p.481-492, 2000.

WATSON, P. F.; DUNCAN, A. E. Effect of salt concentration and unfrozenwater fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 25, p. 131-142, 1988.

WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 183, v. 232-237, 1992.

WOLF, C.A.; Análise do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite: efeito da corticoterapia. 2011. 150F. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre.

WOLFE, D. F.; BRADLEY, J. T.; RIDDELL, M. G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v. 40, n. 5, p. 1083-91, 1993.

WU, W.; GAO, Q.; CHEN, J.; YE, J.; QIAN, Y.; LI, J.; LU, H.; MENG, Z.; NI, C.; ZHONG, B. Analysis of two-dimensional gel electrophoresis images of protein from posterior silk gland of silkworm (*Bombyx mori*) on day 1 and day 4 in the 5th Instar stage. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 2, p. 249-254, 2007.

ZALATA, A.; HAFEZ, T.; SCHOONJANS, F.; COMHAIRE, F. The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. **Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 761-764, 1996.

ZHU, J.; XU, X.; COSGROVE, J. R.; FOXEROFT, G. R. Effects of semen plasma from different fractions of individual ejaculates on IVF in pigs. **Theriogenology**, v. 54, p. 1443-1452, 2000.

ZINI, A.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: level of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 183-188, 1993.

APÊNDICE A

ExPASy - PeptideMass

<http://br.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.p>

[ExPASy Home page](#)
 [Site Map](#)
 [Search ExPASy](#)
 [Contact us](#)
 [Proteomics tools](#)
 [Swiss-Prot](#)
 Search for

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExPASy and complete [our online survey!](#)

PeptideMass

The entered protein is: TRFL_HORSE

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 1

All cysteines have been treated with Iodoacetamide to form carbamidomethyl-cysteine (Cys_CAM), with acrylamide adducts (Cys_PAM).

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 750 Dalton.

Using average masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as [M+H].

You have selected TRFL_HORSE (O77811) from UniProtKB/Swiss-Prot:

Lactotransferrin precursor (EC 3.4.21.-) (Lactoferrin) (Fragment)
Signal in positions <1-6 has been removed.

- Chain Lactotransferrin at positions 7 - 695 [Theoretical pI: 8.32 / Mw (average mass): 75420.48]

mass	position	#MC	artif. modification(s)	peptide sequence	
4576.2466	128-170	1	Cys_CAM: 163, 166	4690.3506	SACWNIPIGTLRPLYLNWTGP
			Cys_PAM: 163, 166	4718.4042	PEPLQKAVANFFSASCVPKA DGK
4143.5678	644-679	1	Cys_CAM: 653	4200.6198	NLLFNDNTECLAELQGKTTY EQYLGSEYVTSITNLR
			Cys_PAM: 653	4214.6466	
3979.3490	492-528	1	Cys_CAM: 497, 508, 511, 521	4207.5570	FFSQSCAPGADPQSSLCALC VGNNENENKMPNSEER
			Cys_PAM: 497, 508, 511, 521	4263.6642	
3833.3749	411-446	1	Cys_CAM: 411, 431	3947.4789	CGLVPVLAENQKSQNSNAPD CVHRPPEGYLAVAVRR
			Cys_PAM: 411, 431	3975.5325	
3719.2578	120-153	1	Cys_CAM: 121	3776.3098	SCHTGLGRSAGWNIPIGTLR PLYLNWTGPPELQK
			Cys_PAM: 121	3790.3366	
3602.1086	375-410	1	Cys_CAM: 377, 386	3716.2126	VACASASTTEECIALVLKGE ADALNLDGGFIYVAGK
			Cys_PAM: 377, 386	3744.2662	
3554.9961	46-79	1	Cys_CAM: 51	3612.0481	TSSFECIQAIANKADAVTL DGGLVYEAGLHPYK
			Cys_PAM: 51	3626.0749	
3474.9411	60-91	1			ADAVTLDGGLVYEAGLHPYK LRPVAAEVYQTR
3422.7397	489-520	1	Cys_CAM: 497, 508, 511	3593.8957	FDKFFSQSCAPGADPQSSLC ALCVGNENENK
			Cys_PAM: 497, 508, 511	3635.9761	
3408.7923	316-347	1			IPSQIDSGLYLGANYLTATQ NLRETAEEVAAR
3355.7745	308-338	1			DSALGFVRIPSQIDSGLYLG ANYLTATQNLNLR
3150.5219	187-216	1	Cys_CAM: 187, 189, 204	3321.6779	CACSSQEPYFGYSGAFKCLE NGAGDVAFVK
			Cys_PAM: 187, 189, 204	3363.7583	
3063.4950	393-422	1	Cys_CAM: 411	3120.5470	GEADALNLDGGFIYVAGKCG LVPVLAENQK
			Cys_PAM: 411	3134.5738	

3032.3004	492-520	0	Cys_CAM: 497, 508, 511	3203.4564	FFSQSCAPGADPQSSLCALC VGNNEENENK
			Cys_PAM: 497, 508, 511	3245.5368	
2932.2955	572-597	1	Cys_CAM: 579, 593	3046.3995	QEDFELLCLDGRKPVAAEAE SCHLAR
			Cys_PAM: 579, 593	3074.4531	
2913.1416	204-230	1	Cys_CAM: 204	2970.1936	CLENGAGDVAFVKDSTVFEN LPDEADR
			Cys_PAM: 204	2984.2204	
2907.3439	128-153	0			SAGWNIPIGTLRPLYLNTWGP PEPLQK
2851.2881	462-488	1	Cys_CAM: 463, 487	2965.3921	SCHTGVGRRTAAWNIPMGLLF NQTGSKC
			Cys_PAM: 463, 487	2993.4457	
2735.0295	178-203	1	Cys_CAM: 179, 187, 189	2906.1855	LCAGTEADKACSSQEPYFG YSGAFK
			Cys_PAM: 179, 187, 189	2948.2659	
2709.0547	423-447	1	Cys_CAM: 431	2766.1067	SQNSNAPDCVHRPPEGYLAV AVVRK
			Cys_PAM: 431	2780.1335	
2673.9661	585-609	1	Cys_CAM: 593	2731.0181	KPVAEAE SCHLARAPNHAVV SQSDR
			Cys_PAM: 593	2745.0449	
2660.0798	616-639	1	Cys_CAM: 631, 636	2774.1838	VLFLQQDQFGGNGPDCPGKF CLFK
			Cys_PAM: 631, 636	2802.2374	
2580.8806	423-446	0	Cys_CAM: 431	2637.9326	SQNSNAPDCVHRPPEGYLAV AVVR
			Cys_PAM: 431	2651.9594	
2562.9383	154-177	1	Cys_CAM: 163, 166, 176	2734.0943	AVANFFSASCVPCADGKQYP NLCR
			Cys_PAM: 163, 166, 176	2776.1747	
2509.8209	316-338	0			IPSQIDSGLYLGANYLTATQ NLR
2443.8403	470-491	1	Cys_CAM: 487	2500.8923	TAAWNIPMGLLFNQTGSKCF DK
			Cys_PAM: 487	2514.9191	
2395.6307	661-680	1			TTYEQYLGSEYVTSITNLR
2368.6202	640-660	1	Cys_CAM: 653	2425.6722	SETKNLLFNDNTECLAELQG K
			Cys_PAM: 653	2439.6990	
2239.4432	661-679	0			TTYEQYLGSEYVTSITNLR
2188.4685	107-127	1	Cys_CAM: 121	2245.5205	GSGFQLNQLQGVKSCHTGLG R
			Cys_PAM: 121	2259.5473	
2149.4284	615-634	1	Cys_CAM: 631	2206.4804	KVLFLQQDQFGGNGPDCPGK
			Cys_PAM: 631	2220.5072	
2090.3399	60-79	0			ADAVTLDGGLVYEAGLHPYK
2071.3899	80-97	1			LRPVAAEVYQTRGKPKQTR
2053.4010	470-488	0	Cys_CAM: 487	2110.4530	TAAWNIPMGLLFNQTGSKC
			Cys_PAM: 487	2124.4798	
2045.2511	521-537	1	Cys_CAM: 521	2102.3031	CMPNSEERYGYTGAFR
			Cys_PAM: 521	2116.3299	
2021.2543	616-634	0	Cys_CAM: 631	2078.3063	VLFLQQDQFGGNGPDCPGK
			Cys_PAM: 631	2092.3331	
2010.3150	233-249	1	Cys_CAM: 237	2067.3670	YELLCPDNTRKPVDAFK
			Cys_PAM: 237	2081.3938	
2003.1755	551-568	1			DVTVLQNTDGKNSEPWAK
1978.2092	543-561	1			AGDVAFAFKDVTVLQNTDGK
1938.3047	374-392	1	Cys_CAM: 377, 386	2052.4087	KVACASASTTEICIALVLK
			Cys_PAM: 377, 386	2080.4623	
1923.1473	644-660	0	Cys_CAM: 653	1980.1993	NLLFNDNTECLAELQGK
			Cys_PAM: 653	1994.2261	

1896.1218	569-584	1	Cys_CAM: 579	1953.1738	DLKQEDFELLCLDGTR
			Cys_PAM: 579	1967.2006	
1859.0544	598-614	1			APNHAVVQSDDRAQHLK
1851.9209	217-232	1			DSTVFENLPDEADRDK
1846.0385	187-203	0	Cys_CAM: 187, 189	1960.1425	CACSSQEPYFGYSGAFK
			Cys_PAM: 187, 189	1988.1961	
1811.0007	393-410	0			GEADALNLDGGFIYVAGK
1810.1306	375-392	0	Cys_CAM: 377, 386	1924.2346	VACASASTTEECIALVLK
			Cys_PAM: 377, 386	1952.2882	
1783.0266	171-186	1	Cys_CAM: 176, 179	1897.1306	QYPNLCRLCAGTEADK
			Cys_PAM: 176, 179	1925.1842	
1687.9254	154-170	0	Cys_CAM: 163, 166	1802.0294	AVANFFSASCVPCADGK
			Cys_PAM: 163, 166	1830.0830	
1659.8569	349-362	1	Cys_CAM: 354	1716.9089	ERVVWCAVGPEEER
			Cys_PAM: 354	1730.9357	
1653.9545	680-694	1	Cys_CAM: 681, 690	1768.0585	RCSSSPLEACAFLR
			Cys_PAM: 681, 690	1796.1121	
1645.9227	250-264	1	Cys_CAM: 251	1702.9747	ECHLARVPSHAVVAR
			Cys_PAM: 251	1717.0015	
1642.8691	529-542	1	Cys_CAM: 538	1699.9211	YYGYTGAFRCLAEK
			Cys_PAM: 538	1713.9479	
1611.8530	45-59	1	Cys_CAM: 51	1668.9050	KTSSFECIQAIANK
			Cys_PAM: 51	1682.9318	
1608.6582	217-230	0			DSTVFENLPDEADR
1584.7687	289-302	1			SSAFQLFKSTPENK
1580.8702	92-105	1			GKPQTRYAVAVVK
1568.8458	681-695	1	Cys_CAM: 681, 690	1682.9498	CSSSPLEACAFLRA
			Cys_PAM: 681, 690	1711.0034	
1539.6997	572-584	0	Cys_CAM: 579	1596.7517	QEDFELLCLDGTR
			Cys_PAM: 579	1610.7785	
1522.6543	447-460	1			KSDADLTWNSLSGK
1522.6543	448-461	1			SDADLTWNSLSGK
1519.7584	11-24	1	Cys_CAM: 15	1576.8104	SVRWCTISPAAEK
			Cys_PAM: 15	1590.8372	
1514.7853	243-255	1	Cys_CAM: 251	1571.8373	KPVDAFKECHLAR
			Cys_PAM: 251	1585.8641	
1504.7287	106-119	1			KGSGFQLNQLQGVK
1502.7280	351-363	1	Cys_CAM: 354	1559.7800	VWCAVGPEEERK
			Cys_PAM: 354	1573.8068	
1497.7670	681-694	0	Cys_CAM: 681, 690	1611.8710	CSSSPLEACAFLR
			Cys_PAM: 681, 690	1639.9246	
1483.6789	46-59	0	Cys_CAM: 51	1540.7309	TSSFECIQAIANK
			Cys_PAM: 51	1554.7577	
1481.7344	303-315	1			DLLEKDSALGFVR
1479.7518	14-27	1	Cys_CAM: 15, 25	1593.8558	WCTISPAAEAKCAK
			Cys_PAM: 15, 25	1621.9094	
1467.6362	231-242	1	Cys_CAM: 237	1524.6882	DKYELLCPDNTR
			Cys_PAM: 237	1538.7150	
1450.6404	256-269	1			VPSHAVWARSVDGR

1411.6185	585-597	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 593</td><td>1468.6705</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 593</td><td>1482.6973</td></tr></table>	Cys_CAM: 593	1468.6705	Cys_PAM: 593	1482.6973	KPVAAEESCHLAR
Cys_CAM: 593	1468.6705							
Cys_PAM: 593	1482.6973							
1403.6239	80-91	0		LRPVAAEVYQTR				
1394.4802	448-460	0		SDADLTWNLSGK				
1376.5546	107-119	0		GGGFQLNQLQGVK				
1374.5539	351-362	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 354</td><td>1431.6059</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 354</td><td>1445.6327</td></tr></table>	Cys_CAM: 354	1431.6059	Cys_PAM: 354	1445.6327	VWCAVGPPEER
Cys_CAM: 354	1431.6059							
Cys_PAM: 354	1445.6327							
1356.5266	276-286	1		LLHRAQEERFGR				
1351.6033	538-550	1	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 538</td><td>1408.6553</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 538</td><td>1422.6821</td></tr></table>	Cys_CAM: 538	1408.6553	Cys_PAM: 538	1422.6821	CLAEKAGDVAFAVK
Cys_CAM: 538	1408.6553							
Cys_PAM: 538	1422.6821							
1351.5937	270-279	1		EDLIWRLLHR				
1346.4851	265-275	1		SVDGREDLIWR				
1323.5061	204-216	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 204</td><td>1380.5581</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 204</td><td>1394.5849</td></tr></table>	Cys_CAM: 204	1380.5581	Cys_PAM: 204	1394.5849	CLENGAGDVAFAVK
Cys_CAM: 204	1380.5581							
Cys_PAM: 204	1394.5849							
1292.4742	297-307	1		STPENKDLLFK				
1281.3703	598-609	0		APNHAVVSQSDR				
1271.5170	411-422	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 411</td><td>1328.5690</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 411</td><td>1342.5958</td></tr></table>	Cys_CAM: 411	1328.5690	Cys_PAM: 411	1342.5958	CGLVPVLAENQK
Cys_CAM: 411	1328.5690							
Cys_PAM: 411	1342.5958							
1224.3735	233-242	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 237</td><td>1281.4255</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 237</td><td>1295.4523</td></tr></table>	Cys_CAM: 237	1281.4255	Cys_PAM: 237	1295.4523	YELLCPDNTR
Cys_CAM: 237	1281.4255							
Cys_PAM: 237	1295.4523							
1223.3484	364-373	1	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 364</td><td>1280.4004</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 364</td><td>1294.4272</td></tr></table>	Cys_CAM: 364	1280.4004	Cys_PAM: 364	1294.4272	CKQWSDVSNR
Cys_CAM: 364	1280.4004							
Cys_PAM: 364	1294.4272							
1190.2952	551-561	0		DVTVLQNTDGK				
1188.3251	562-571	1		NSEPWAKDLK				
1177.3601	14-24	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 15</td><td>1234.4121</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 15</td><td>1248.4389</td></tr></table>	Cys_CAM: 15	1234.4121	Cys_PAM: 15	1248.4389	WCTISPAAEAK
Cys_CAM: 15	1234.4121							
Cys_PAM: 15	1248.4389							
1170.3532	287-296	1		NKSSAFQLFK				
1120.2096	366-374	1		QWSDVSNRK				
1103.3211	635-643	1	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 636</td><td>1160.3731</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 636</td><td>1174.3999</td></tr></table>	Cys_CAM: 636	1160.3731	Cys_PAM: 636	1174.3999	FCLFKSETK
Cys_CAM: 636	1160.3731							
Cys_PAM: 636	1174.3999							
1098.2025	529-537	0		YYGYTGAFR				
1079.1571	280-288	1		AQEEFGRNK				
1074.2861	35-44	1	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 42</td><td>1131.3381</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 42</td><td>1145.3649</td></tr></table>	Cys_CAM: 42	1131.3381	Cys_PAM: 42	1145.3649	VRGPSVSCIR
Cys_CAM: 42	1131.3381							
Cys_PAM: 42	1145.3649							
1074.1816	339-348	1		ETAEEVAARR				
1041.2783	98-106	1		YYAVAVVK				
992.0355	366-373	0		QWSDVSNR				
966.0713	521-528	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 521</td><td>1023.1233</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 521</td><td>1037.1501</td></tr></table>	Cys_CAM: 521	1023.1233	Cys_PAM: 521	1037.1501	CMPNSEER
Cys_CAM: 521	1023.1233							
Cys_PAM: 521	1037.1501							
947.1401	37-45	1	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 42</td><td>1004.1921</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 42</td><td>1018.2189</td></tr></table>	Cys_CAM: 42	1004.1921	Cys_PAM: 42	1018.2189	GPSVSCIRK
Cys_CAM: 42	1004.1921							
Cys_PAM: 42	1018.2189							
945.0839	461-469	1	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 463</td><td>1002.1359</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 463</td><td>1016.1627</td></tr></table>	Cys_CAM: 463	1002.1359	Cys_PAM: 463	1016.1627	KSCHTGVGR
Cys_CAM: 463	1002.1359							
Cys_PAM: 463	1016.1627							
936.1016	256-264	0		VPSHAVVAR				
928.0753	289-296	0		SSAFQLFK				
917.9941	339-347	0		ETAEEVAAR				
913.1042	98-105	0		YYAVAVVK				
908.0137	178-186	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 179</td><td>965.0657</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 179</td><td>979.0925</td></tr></table>	Cys_CAM: 179	965.0657	Cys_PAM: 179	979.0925	LCAGTEADK
Cys_CAM: 179	965.0657							
Cys_PAM: 179	979.0925							
894.0356	171-177	0	<table border="1"><tr><td>Cys_CAM: 176</td><td>951.0876</td></tr><tr><td>Cys_PAM: 176</td><td>965.1144</td></tr></table>	Cys_CAM: 176	951.0876	Cys_PAM: 176	965.1144	QYPNLQR
Cys_CAM: 176	951.0876							
Cys_PAM: 176	965.1144							
864.9763	308-315	0		DSALGFVR				

836.8792	280-286	0		AQEEFGR	
831.9463	270-275	0		EDLIWR	
831.9030	562-568	0		NSEPWAK	
830.9366	120-127	0	Cys_CAM: 121	887.9886	SCHTGLGR
			Cys_PAM: 121	902.0154	
823.9880	28-33	1		FQRNMK	
818.9660	37-44	0	Cys_CAM: 42	876.0180	GPSVSGIR
			Cys_PAM: 42	890.0448	
816.9098	462-469	0	Cys_CAM: 463	873.9618	SCHTGVGR
			Cys_PAM: 463	887.9886	
806.9367	543-550	0		AGDVAFVK	
804.9642	243-249	0		KPVDAFK	
752.9092	25-30	1	Cys_CAM: 25	809.9612	CAKFQR
			Cys_PAM: 25	823.9880	

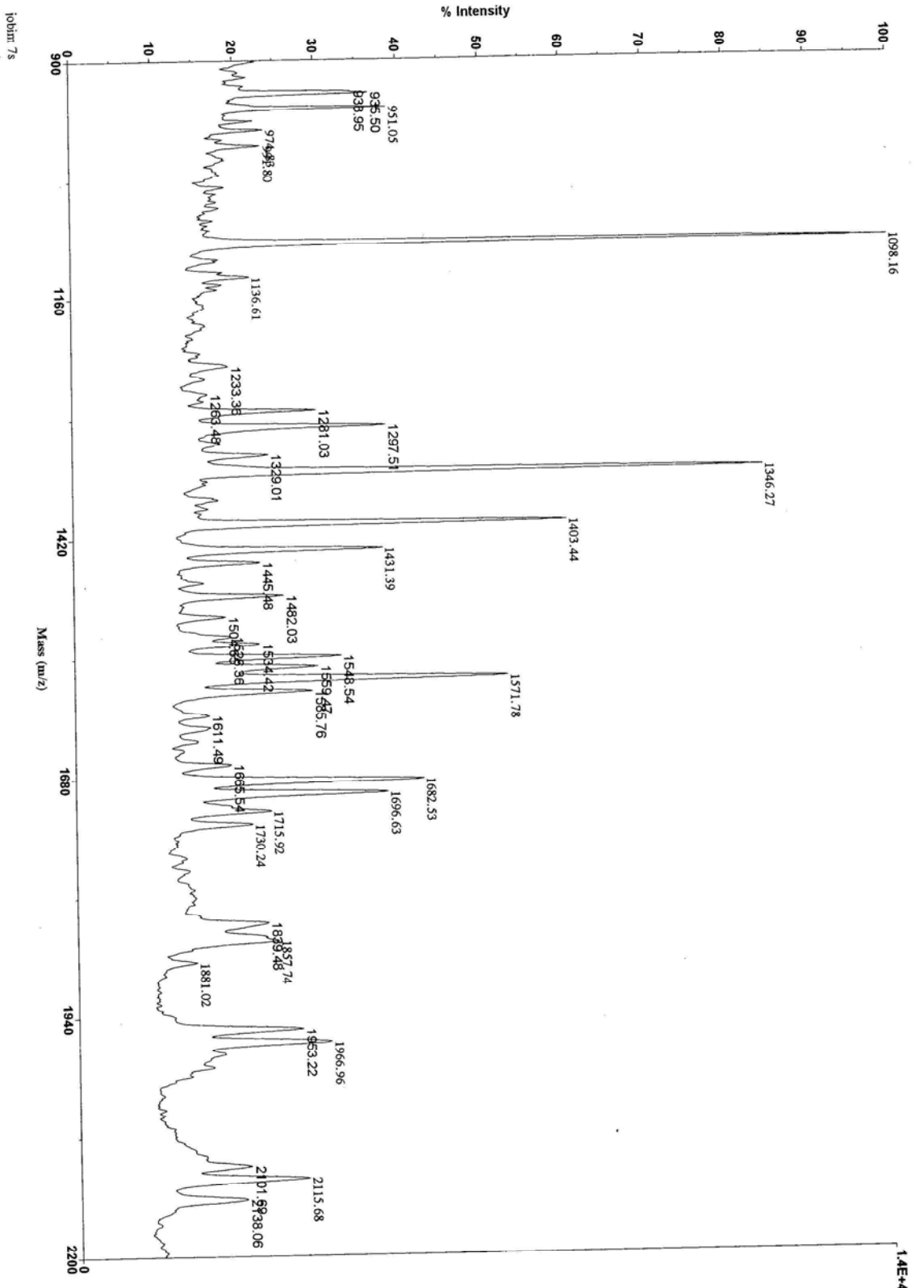
99.3% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 750 Da):

```

10      20      30      40      50      60
aprK  SVRKCITISFA EAAKCAKFKR NMKKVRGPNV SCIRKTSSTF CIQAIANKA
70      80      90      100     110     120
DAVLDLGGGLV YERGLHPYKL RPYAAEVYQT RQKPKQTRYA VAVVKKSGSF QLNQLQGVKS
130     140     150     160     170     180
CHTGLGRSAG WNIPIGTLRF YLAWTGPPEP LQKAVANFFS ASCVFCADGK QYFNLCRLCA
190     200     210     220     230     240
GTEADKACCS SQEYPFGYSG AFKCLENGAG DVAEVKDSIV FENLPDEADR DKYELLPDNI
250     260     270     280     290     300
TRKPFVDAFKE CHLARVPGRH VVARSVDGRE DLIWRLLHRA QEEFGRNKSQ AFQLEKSTPE
310     320     330     340     350     360
NKDLLEKDSA LGFVRIFSQI DSGLYLGANY LTATQNLRET AAEVAARSR VVWCAVGPPE
370     380     390     400     410     420
ERKCKQWSDV SNRKYACASA STTEECIALV LKGEADALNI DGGFIYVAGK CGLVFPVLAEN
430     440     450     460     470     480
QNSQNSNAPD CVHRPPEGYL AVAVVRKSDA DLTWNSLSGR KSCHTGVGRT AAWNIPMGLL
490     500     510     520     530     540
FNQTGCKED KFFSQSCAPG ADPQESLCAI CVGNNEENK CMFNSEERY YGTGAFRCIA
550     560     570     580     590     600
EKAGEVAFVK DVTVLQNDG KNEPWAQDL RQEDFELLCL DCTRKPVAEA ESCHLAPAPN
610     620     630     640     650     660
HAVVQSDDRA QHLKVLFLQ QDQFGNGPD CPQKFLFKS ETRNLLFNIN TECLAELQCK
670     680     690
TTYEQYLGSE YVTSITNLRK CSSSPLLEAC AFLRA
    
```

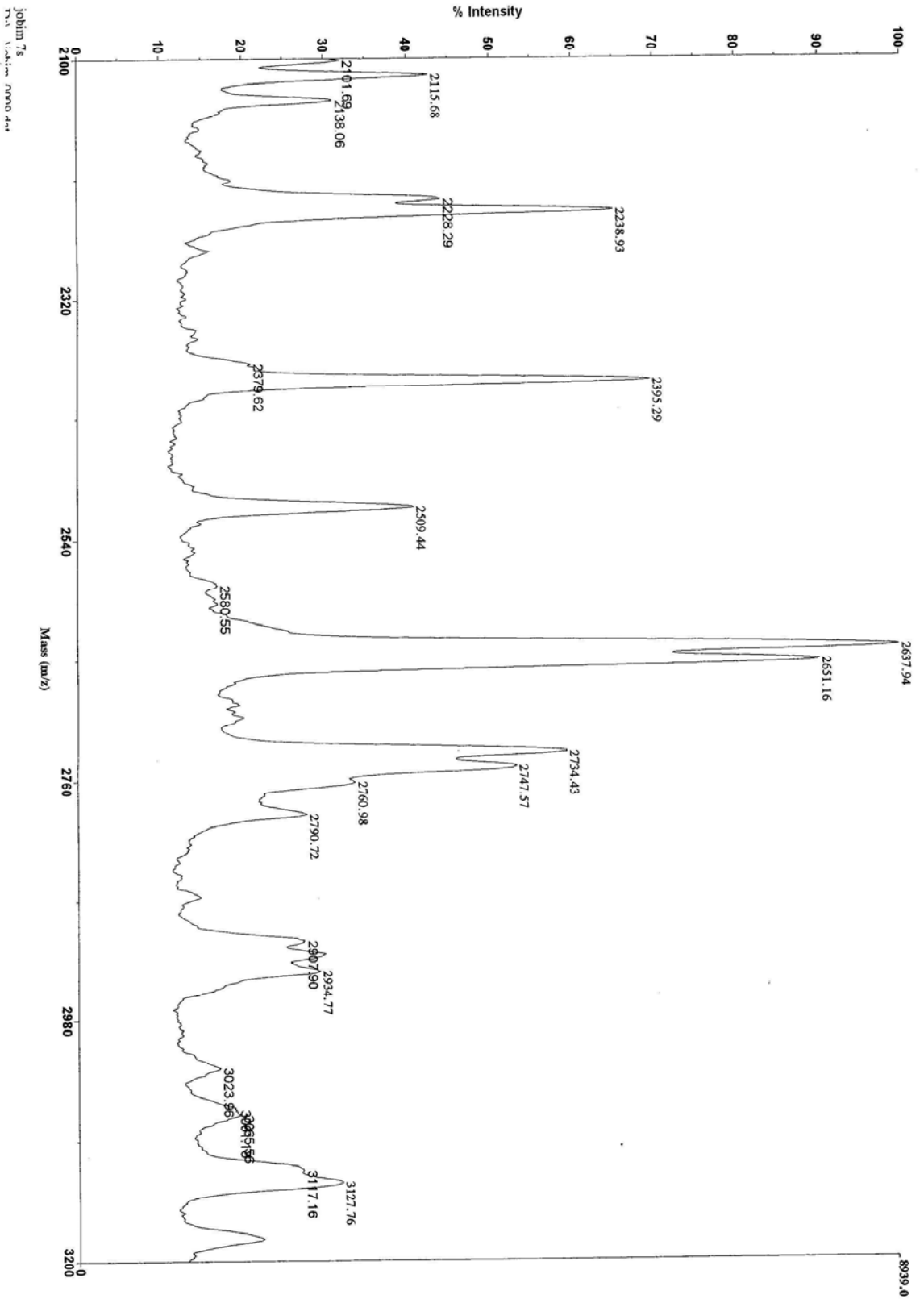
[Display the list of masses](#) in raw text format to be exported into an external application

Voyager Spec #1 => SM19 => MC[BP = 551.6, 26495]

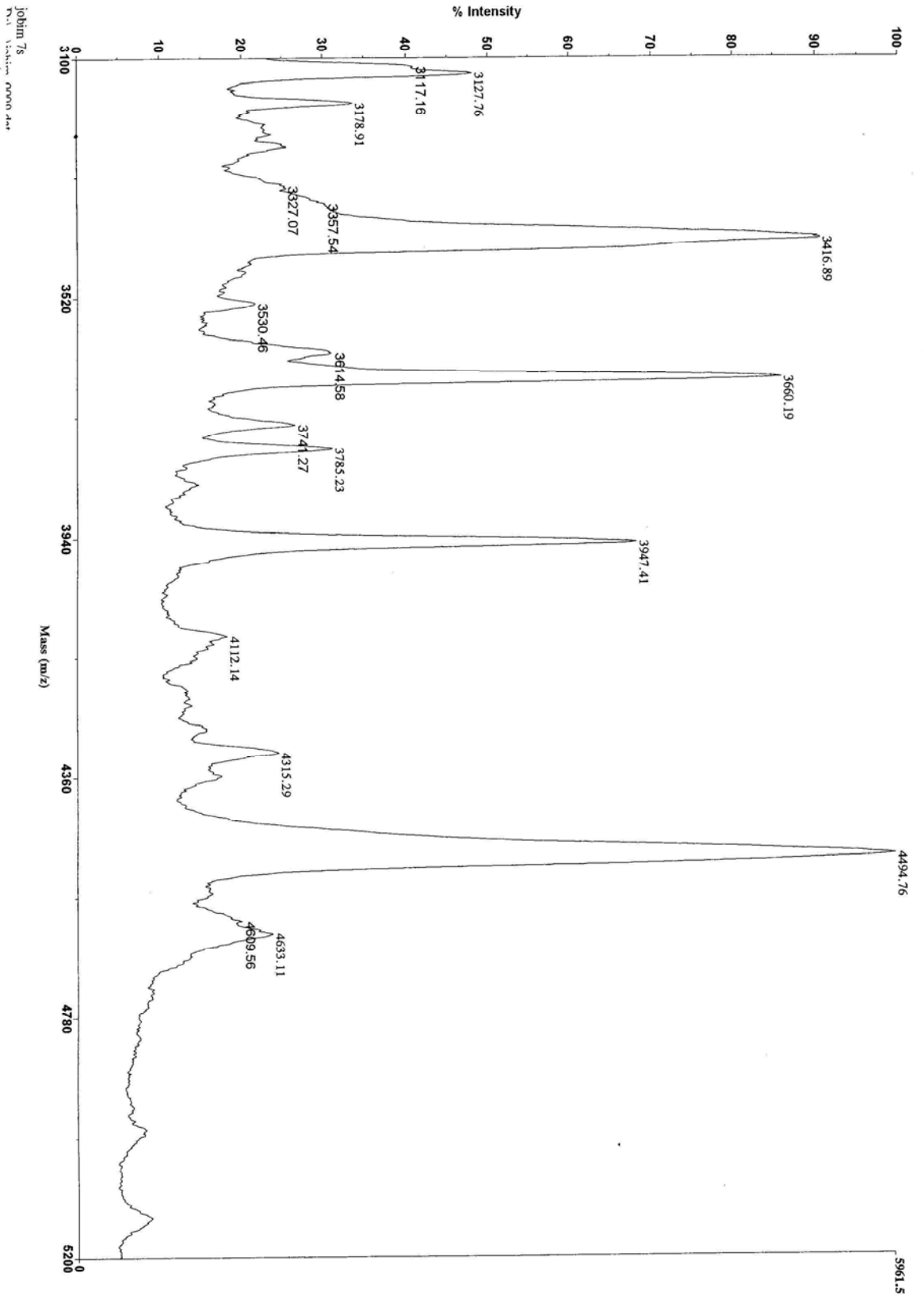


Jobin 7s

Voyager Spec #1 => SM19 => MC[BP = 551.6, 26495]



Voyager Spec #1 => SMI9 => MCI[BP = 551.6, 26495]



APPENDICE B

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExPASy and complete our online survey!

PeptideMass

The entered protein is: KLK2_HORSE

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 1

All cysteines have been treated with Iodoacetamide to form carbamidomethyl-cysteine (Cys_CAM), with acrylamide adducts (Cys_PAM).

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 750 Dalton.

Using average masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as [M+H].

You have selected KLK2_HORSE (Q6H321) from UniProtKB/Swiss-Prot:

Kallikrein-1E2 precursor (EC 3.4.21.35) (Glandular kallikrein) (HPK)
 Signal and propep in positions 1-24 have been removed.

- Chain Kallikrein-1E2 at positions 25 - 261 [Theoretical pl: 5.51 / Mw (average mass): 26750.28]

mass	position	#MC	artif.modification(s)	peptide sequence
8547.4974	34-107	1	Cys_CAM: 50, 66 8661.6014	HSKPWQVAVYHQGHFQCGGV LVHPQWVLTAAHCMSDDYQI WLGRHNLSSEDEDTAQFHQVS DSFLDPQFDLSLLK
			Cys_PAM: 50, 66 8689.6550	
6104.9781	25-77	1	Cys_CAM: 31, 50, 66 6276.1341	IIGGWECEKHSPWQVAVYH QGHFQCGGVLVHPQWVLTAA HCMSDDYQIWLGR
			Cys_PAM: 31, 50, 66 6318.2145	
5803.4116	192-245	1	Cys_CAM: 198, 209, 219, 234 6031.6196	MTEFVLCATHRDDSGSICLG DSGGALICDGVFQGITSWGY SECADFNDNFVFTK
			Cys_PAM: 198, 209, 219, 234 6087.7268	
5219.7950	203-251	1	Cys_CAM: 209, 219, 234 5390.9510	DDSGSICLGDSSGALICDGV FQGITSWGYSECADFNDNFV FTKVMPHLK
			Cys_PAM: 209, 219, 234 5433.0314	
5088.7984	34-77	0	Cys_CAM: 50, 66 5202.9024	HSKPWQVAVYHQGHFQCGGV LVHPQWVLTAAHCMSDDYQI WLGR
			Cys_PAM: 50, 66 5230.9560	
4513.8785	203-245	0	Cys_CAM: 209, 219, 234 4685.0345	DDSGSICLGDSSGALICDGV FQGITSWGYSECADFNDNFV FTK
			Cys_PAM: 209, 219, 234 4727.1149	
3605.8958	78-108	1		HNLSSEDEDTAQFHQVSDSFL DPQFDLSLLK
3477.7217	78-107	0		HNLSSEDEDTAQFHQVSDSFL DPQFDLSLLK
3209.6185	148-177	1	Cys_CAM: 152, 173 3323.7225	LGSTCYTSGWGLISTFTNNG SGTLCQVELR
			Cys_PAM: 152, 173 3351.7761	
3200.6331	138-166	1	Cys_CAM: 152 3257.6851	ILDLPQEPKLGSTCYTSGW GLISTFTNR
			Cys_PAM: 152 3271.7119	
2658.0930	110-131	1		YLRPYDDISHDMLLLRAQP AR

2149.5152	109-125	1		KYLRPYDDISHDLMLLR
2065.3075	148-166	0	Cys_CAM: 152 2122.3595 Cys_PAM: 152 2136.3863	LGSTCYTSGWGLISTFTNR
2021.3411	110-125	0		YLRPYDDISHDLMLLR
1897.2169	187-202	1	Cys_CAM: 198 1954.2689 Cys_PAM: 198 1968.2957	AYPEKMTEFVLCATHR
1863.0954	167-183	1	Cys_CAM: 173 1920.1474 Cys_PAM: 173 1934.1742	GSGLTQCVELRLQSNK
1782.0869	132-147	1		ITDAVKILDLPTEPK
1308.5558	192-202	0	Cys_CAM: 198 1365.6078 Cys_PAM: 198 1379.6346	MTEFVLCATHR
1283.5132	126-137	1		LAQPARITDAVK
1163.3337	167-177	0	Cys_CAM: 173 1220.3857 Cys_PAM: 173 1234.4125	GSGLTQCVELR
1154.3483	138-147	0		ILDLPTEPK
1152.4859	246-254	1		VMPHLKWK
1049.1895	178-186	1	Cys_CAM: 184 1106.2415 Cys_PAM: 184 1120.2683	LQSNKCAR
1047.2390	252-259	1		WIKETIEK
1035.2024	25-33	0	Cys_CAM: 31 1092.2544 Cys_PAM: 31 1106.2812	IIGWECEK
938.0889	184-191	1	Cys_CAM: 184 995.1409 Cys_PAM: 184 1009.1677	CARAYPEK
820.8743	255-261	1		ETIEKNS

100.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 750 Da):

```

10      20      30      40      50      60
      IIGWE CEKHSRFPQV AVYHQCHPQC GGLVHPQV
70      80      90      100     110     120
LTAAHMSDD YQIWLGRHNL SEDEDTAOFH QVSDSFLDPO FDLSLKKKV LRPYDDISHD
130     140     150     160     170     180
LMLLRLAQPA RITDAVKILD LPTQEPKLG S TCYTSGWGLI STFINRSGGT LQCVELRLQS
190     200     210     220     230     240
NEKCARAYFE KNTFVLCAT HRDDSGSICL GDSGGALICD GVFGGITSWG YSECADFNEN
250     260
FVETKVMPHL KWIKETIEKN S

```

[Display the list of masses](#) in raw text format to be exported into an external application

[ExpASY Home page](#)

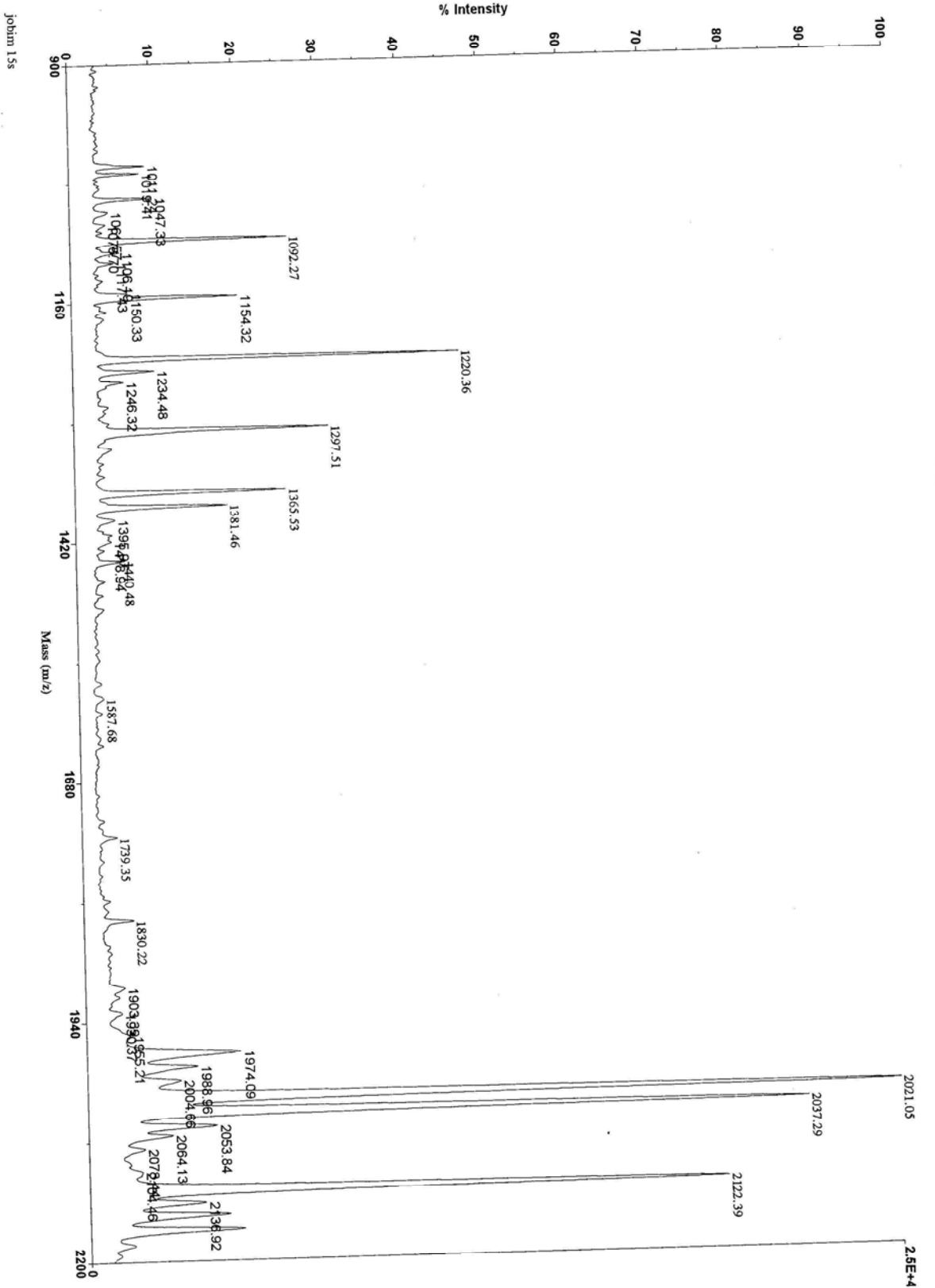
[Site Map](#)

[Search ExPASy](#)

[Contact us](#)

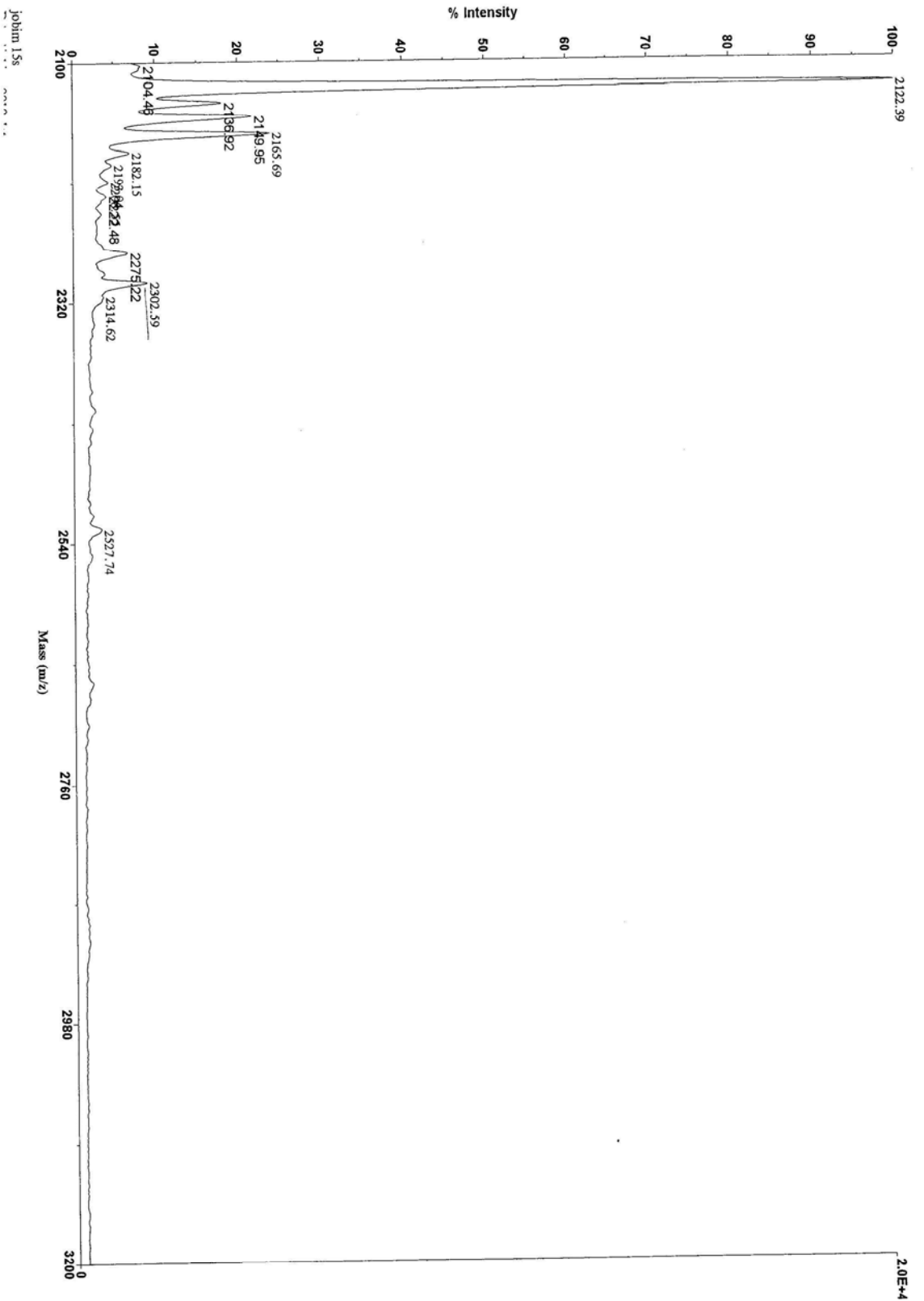
[Proteomics tools](#)

[Swiss-Prot](#)

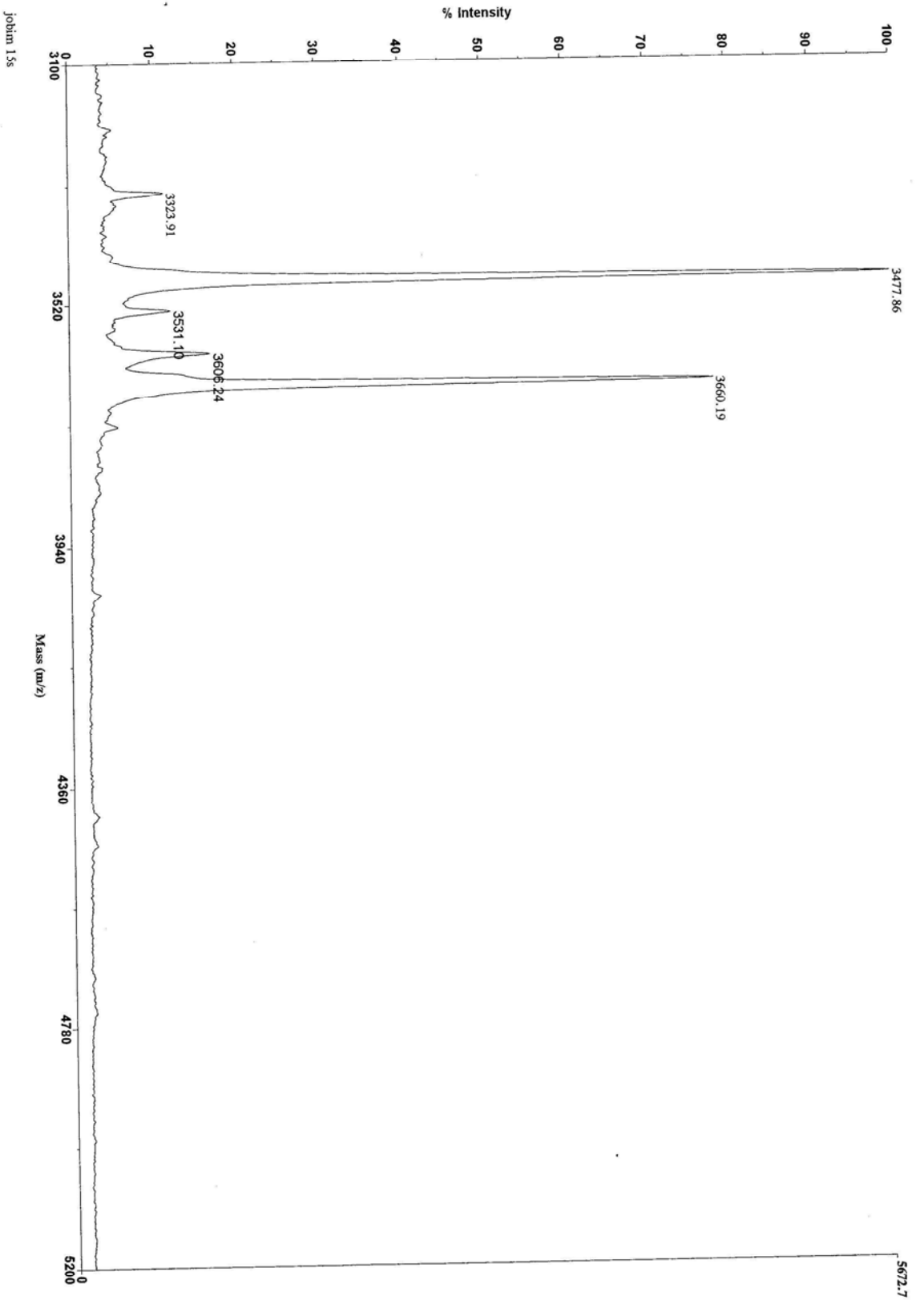


jobinn 15s

Voyager Spec #1 => SM19 => MCLBP = 2020.8, 249351



Jobin 156



Jobin 15s

APÊNDICE C

ExPASy - PeptideMass

<http://br.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>

[ExPASy Home page](#)
 [Site Map](#)
 [Search ExPASy](#)
 [Contact us](#)
 [Proteomics tools](#)
 [Swiss-Prot](#)

Search for

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExPASy and complete our [online survey!](#)

PeptideMass

The entered protein is: CRIS3_HORSE

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 1

All cysteines have been treated with Iodoacetamide to form carbamidomethyl-cysteine (Cys_CAM), with acrylamide adducts (Cys_PAM).

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 750 Dalton.

Using average masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as [M+H].

You have selected CRIS3_HORSE (O19010) from UniProtKB/Swiss-Prot:

Cysteine-rich secretory protein 3 precursor (CRISP-3)
Signal in positions 1-22 has been removed.

- Chain Cysteine-rich secretory protein 3 at positions 23 - 245 [Theoretical pI: 7.54 / Mw (average mass): 25025.23]

mass	position #	MC	artif. modification(s)	peptide sequence	
4329.7358	181-220	1	Cys_CAM: 191, 194, 198, 203, 207, 216	4672.0478	INTPYEQGTPCARCPGNCND
			Cys_PAM: 191, 194, 198, 203, 207, 216	4756.2086	GLCTNSCEYEDLVSNCDLTK
4010.4031	96-130	1	Cys_CAM: 96	4067.4551	CGENLFMSSIPNSWSDAIQN
			Cys_PAM: 96	4081.4819	WHDEVHDFKYGVGPK
3996.4350	90-124	1	Cys_CAM: 96	4053.4870	AVGTMKCGENLFMSSIPNSW
			Cys_PAM: 96	4067.5138	SDAIQNWDEVHDFK
3408.6999	96-124	0	Cys_CAM: 96	3465.7519	CGENLFMSSIPNSWSDAIQN
			Cys_PAM: 96	3479.7787	WHDEVHDFK
3380.7913	165-193	1	Cys_CAM: 169, 172, 191	3551.9473	YYYVCQYCPAGNYVNKINTP
			Cys_PAM: 169, 172, 191	3594.0277	YEQGTPCAR
3220.6904	131-159	1	Cys_CAM: 152, 157	3334.7944	TPNAVVGHYTQVWVYSSYR
			Cys_PAM: 152, 157	3362.8480	GCGIAYCPK
3026.3239	194-221	1	Cys_CAM: 194, 198, 203, 207, 216	3311.5839	CPGNCNDGLCTNSCEYEDLV
			Cys_PAM: 194, 198, 203, 207, 216	3381.7179	SNCDLTK
2898.1498	194-220	0	Cys_CAM: 194, 198, 203, 207, 216	3183.4098	CPGNCNDGLCTNSCEYEDLV
			Cys_PAM: 194, 198, 203, 207, 216	3253.5438	SNCDLTK
2830.1746	125-149	1			YGVGPKTPNAVVGHYTQVWV
2476.8265	160-180	1	Cys_CAM: 169, 172	2590.9305	QGTLYYYYVCQYCPAGNYVN
			Cys_PAM: 169, 172	2618.9841	K
2228.4714	131-149	0			TPNAVVGHYTQVWVYSSYR

2029.2804	68-85	1	Cys_CAM: 79	2086.3324	TATNAQNWANKLLQHSK
			Cys_PAM: 79	2100.3592	
1995.1761	62-78	1			MQWDSKTATNAQNWANK
1949.2053	165-180	0	Cys_CAM: 169, 172	2063.3093	YYVVCQYCPAGNYVVK
			Cys_PAM: 169, 172	2091.3629	
1937.2790	51-67	1			TVSPLASNMLKMQWDSK
1820.0521	23-39	1			QDPGFAALSITKSEVQK
1587.8488	222-235	1	Cys_CAM: 225, 234	1701.9528	IAGCEHELLKENCK
			Cys_PAM: 225, 234	1730.0064	
1538.8629	150-164	1	Cys_CAM: 152, 157	1652.9669	VGCGIAYCPKQGTLK
			Cys_PAM: 152, 157	1681.0205	
1450.6087	181-193	0	Cys_CAM: 191	1507.6607	INTPYEQGTPCAR
			Cys_PAM: 191	1521.6875	
1401.5668	232-243	1	Cys_CAM: 234, 238, 240	1572.7228	ENCKTTCQCENK
			Cys_PAM: 234, 238, 240	1614.8032	
1317.5891	50-61	1			RTVSPLASNMLK
1300.4748	79-89	1	Cys_CAM: 79	1357.5268	LLQHSKAEDR
			Cys_PAM: 79	1371.5536	
1248.4210	23-34	0			QDPGFAALSITK
1241.4907	221-231	1	Cys_CAM: 225	1298.5427	KIAGCEHELLK
			Cys_PAM: 225	1312.5695	
1238.3885	40-49	1			EIVNKHNDLR
1219.2987	68-78	0			TATNAQNWANK
1203.3700	236-245	1	Cys_CAM: 238, 240	1317.4740	TTCQCENKIY
			Cys_PAM: 238, 240	1345.5276	
1174.3392	35-44	1			SEVQKEIVNK
1161.4016	51-61	0			TVSPLASNMLK
1113.3166	222-231	0	Cys_CAM: 225	1170.3686	IAGCEHELLK
			Cys_PAM: 225	1184.3954	
1078.2282	86-95	1			AEDRAVGTMK
1011.2417	150-159	0	Cys_CAM: 152, 157	1125.3457	VGCGIAYCPK
			Cys_PAM: 152, 157	1153.3993	
927.0346	236-243	0	Cys_CAM: 238, 240	1041.1386	TTCQCENK
			Cys_PAM: 238, 240	1069.1922	
829.0044	79-85	0	Cys_CAM: 79	886.0564	LLQHSK
			Cys_PAM: 79	900.0832	
810.8906	45-50	1			HNDLRR
794.9001	62-67	0			MQWDSK

100.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 750 Da):

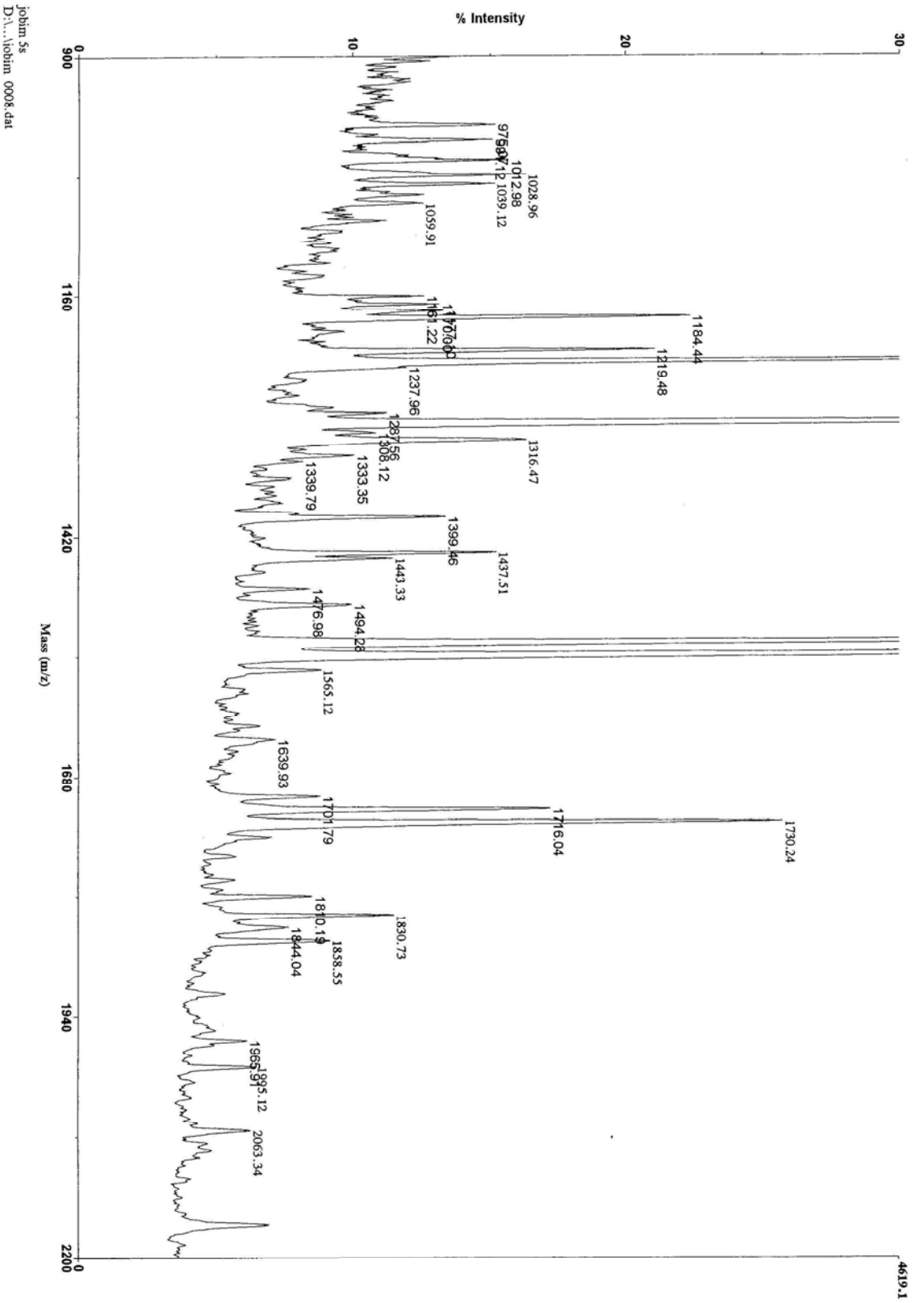
```

10      20      30      40      50      60
      QDPGFAAL SITKSEVQKE IVNKHNDLRR TVSPLASNML
70      80      90      100     110     120
MQWDSKTAT NAQNWANKCLL QHSKAEDRA VGTMKCGENL FMSSIPNSWS DATQNWIDEV
130     140     150     160     170     180
HDFKYGVGPK TPNAVVGHYT QVWVYSSYRV GCGIAYCPKQ GTLKYVVCQ YCPAGNYVVK
190     200     210     220     230     240
INTPYEQGTF CARCPGNCDN GLCTNSCEYE DLVSNCDSLK KIAGCEHELL KENCKTTCQC
ENKIY

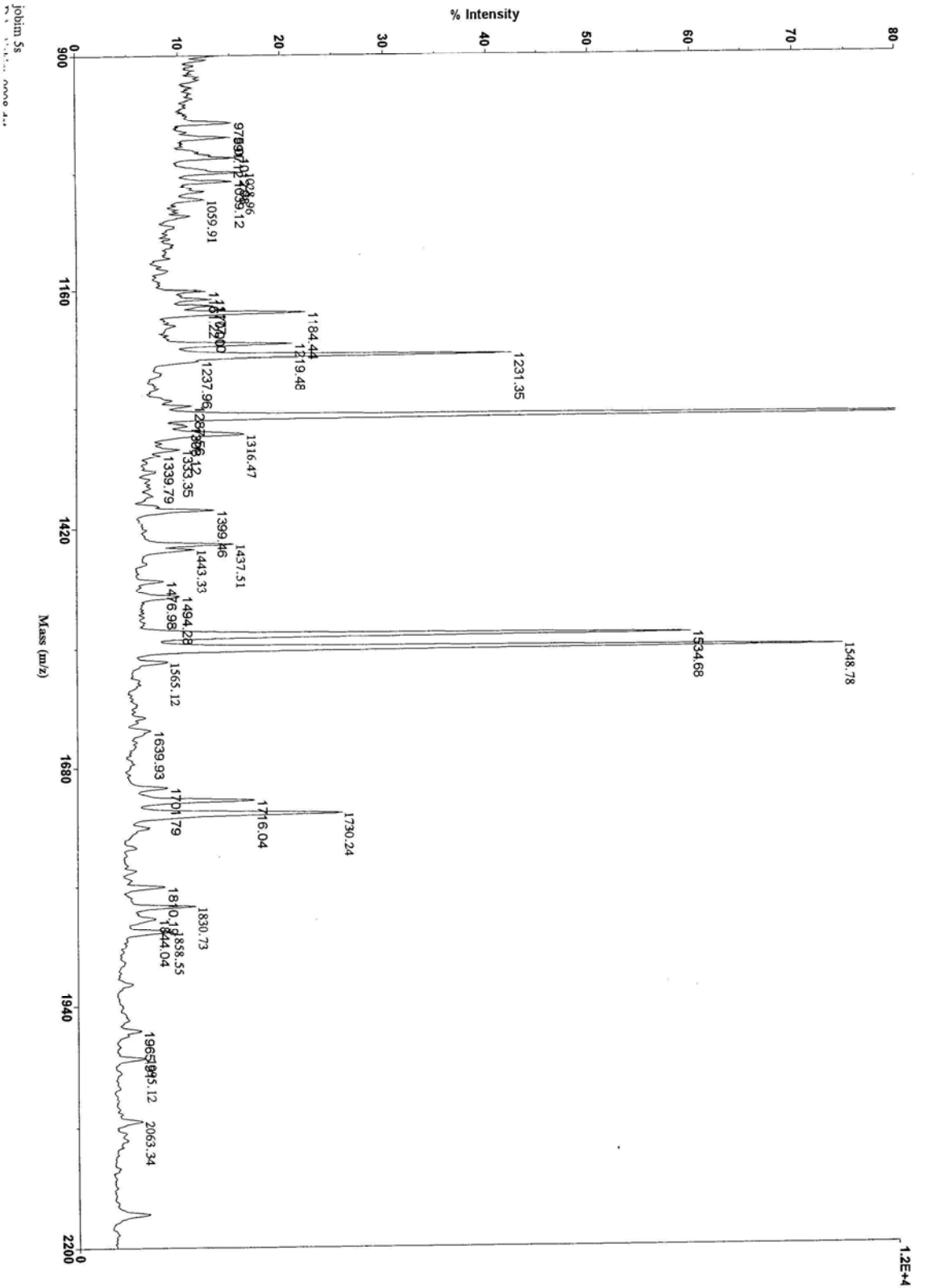
```

[Display the list of masses](#) in raw text format to be exported into an external application

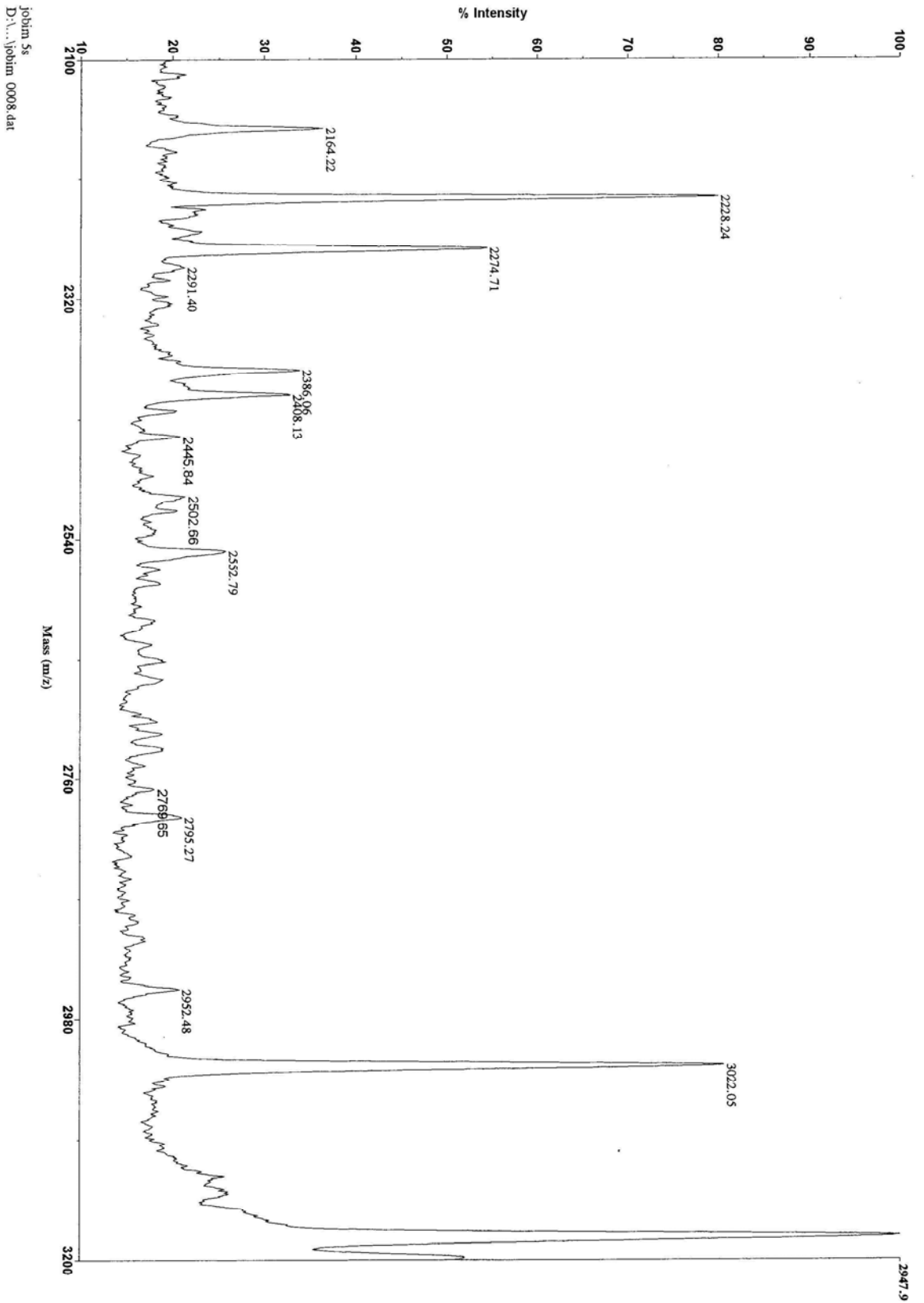
Voyager Spec #1 => SM19 => MCIBP = 1297.2, 15397

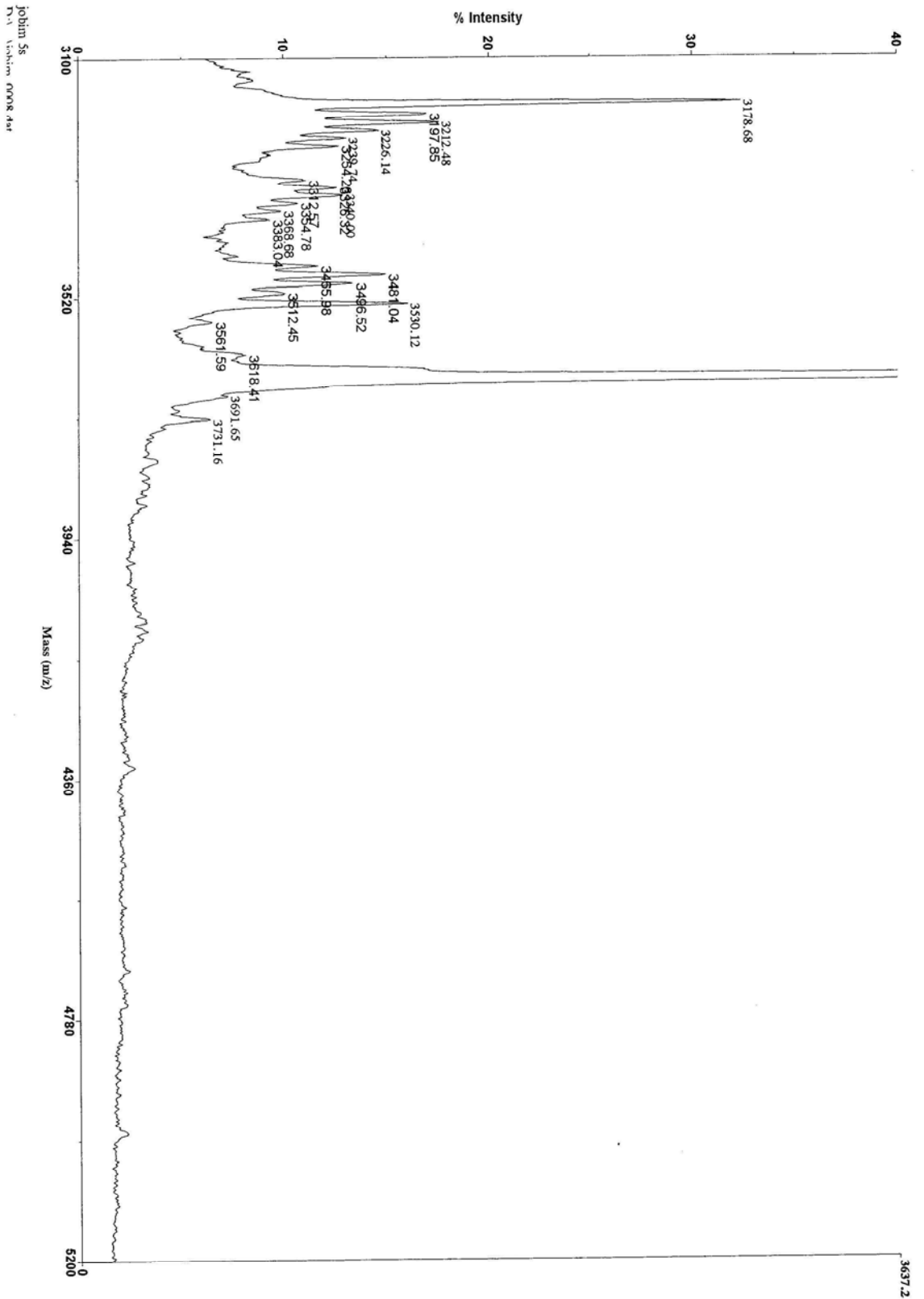


Voyager Spec #1 => SM19 => MCIBP = 1297.2, 15397]

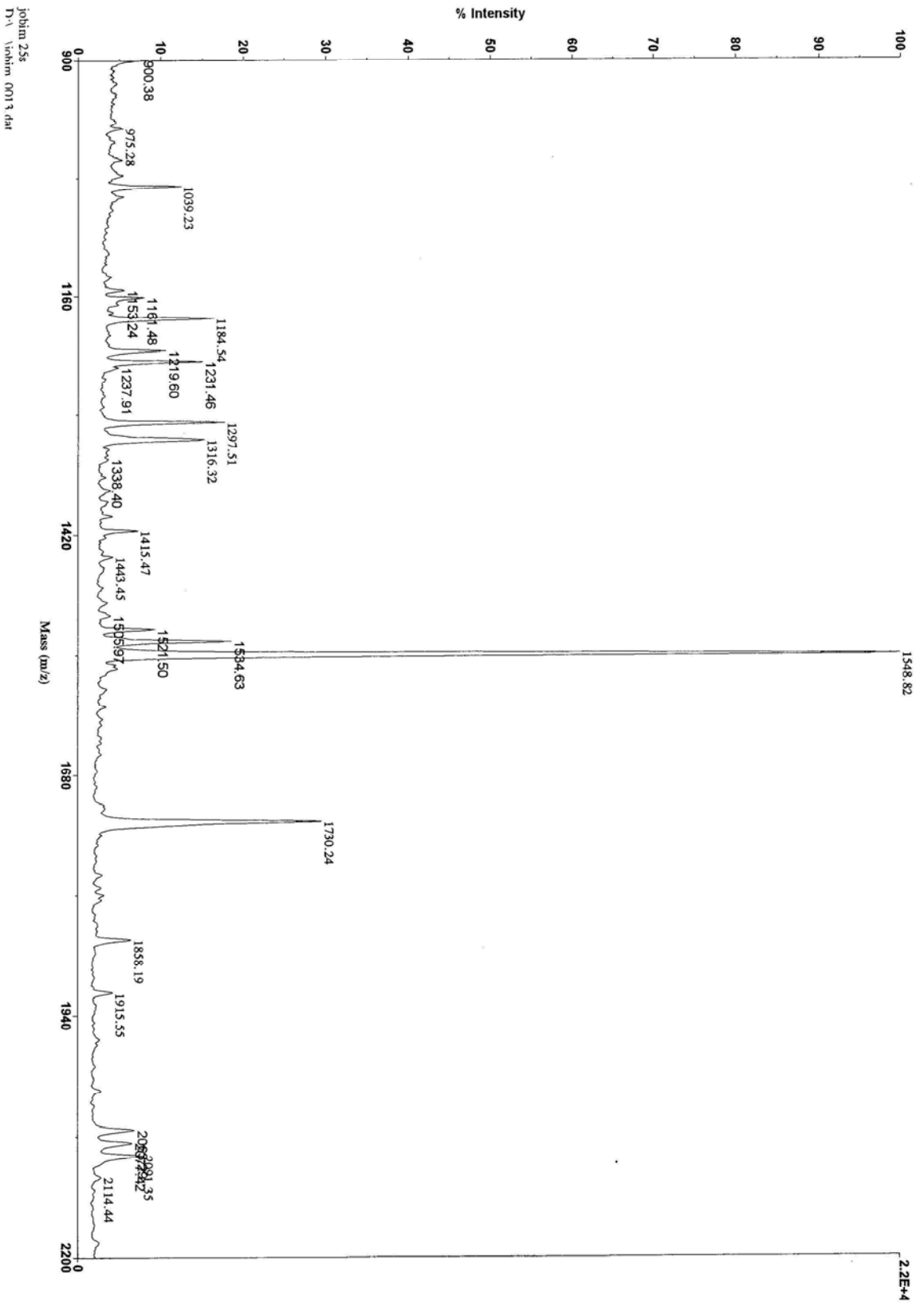


Jobin S5
M 1 1297.2, 15397

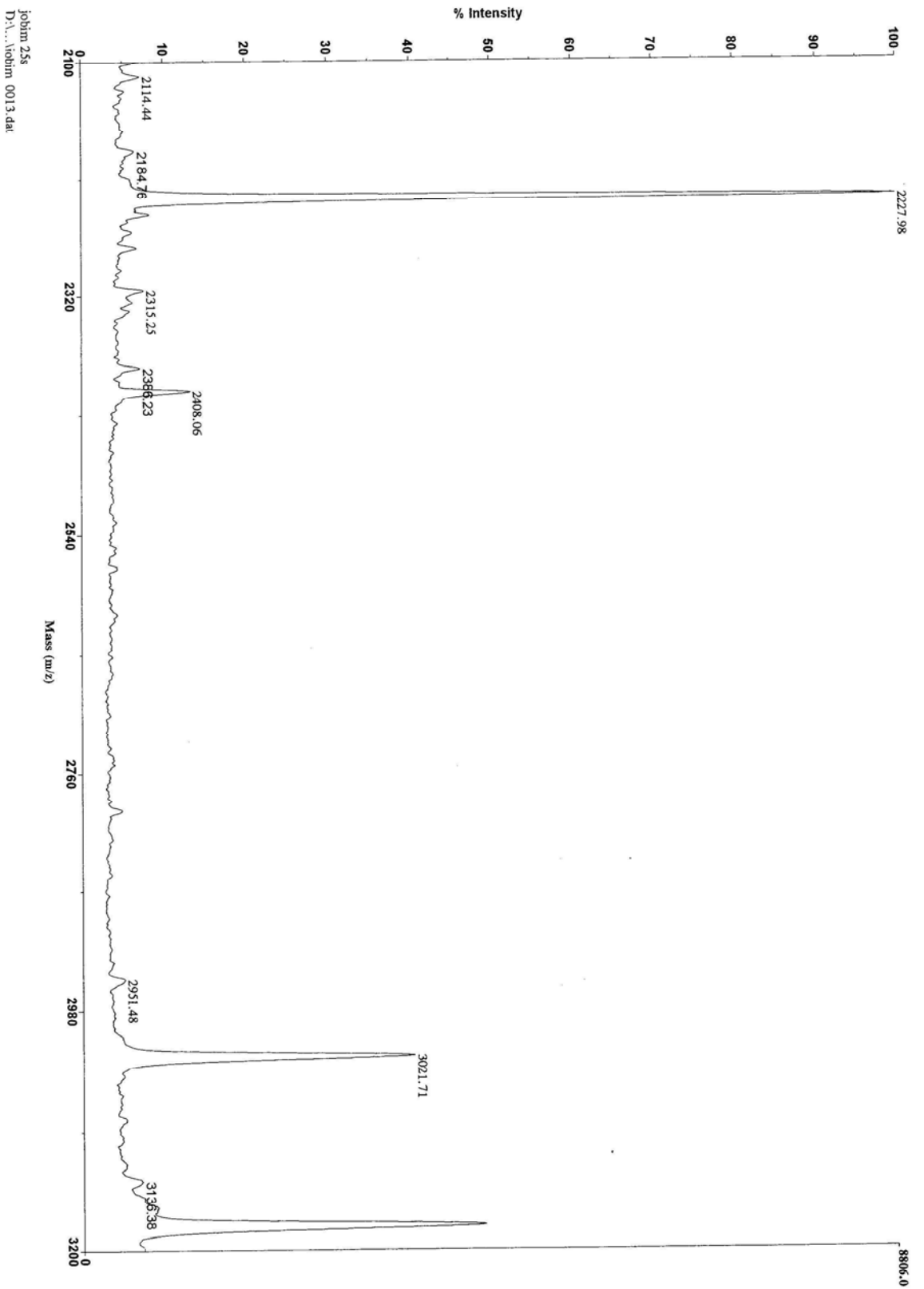




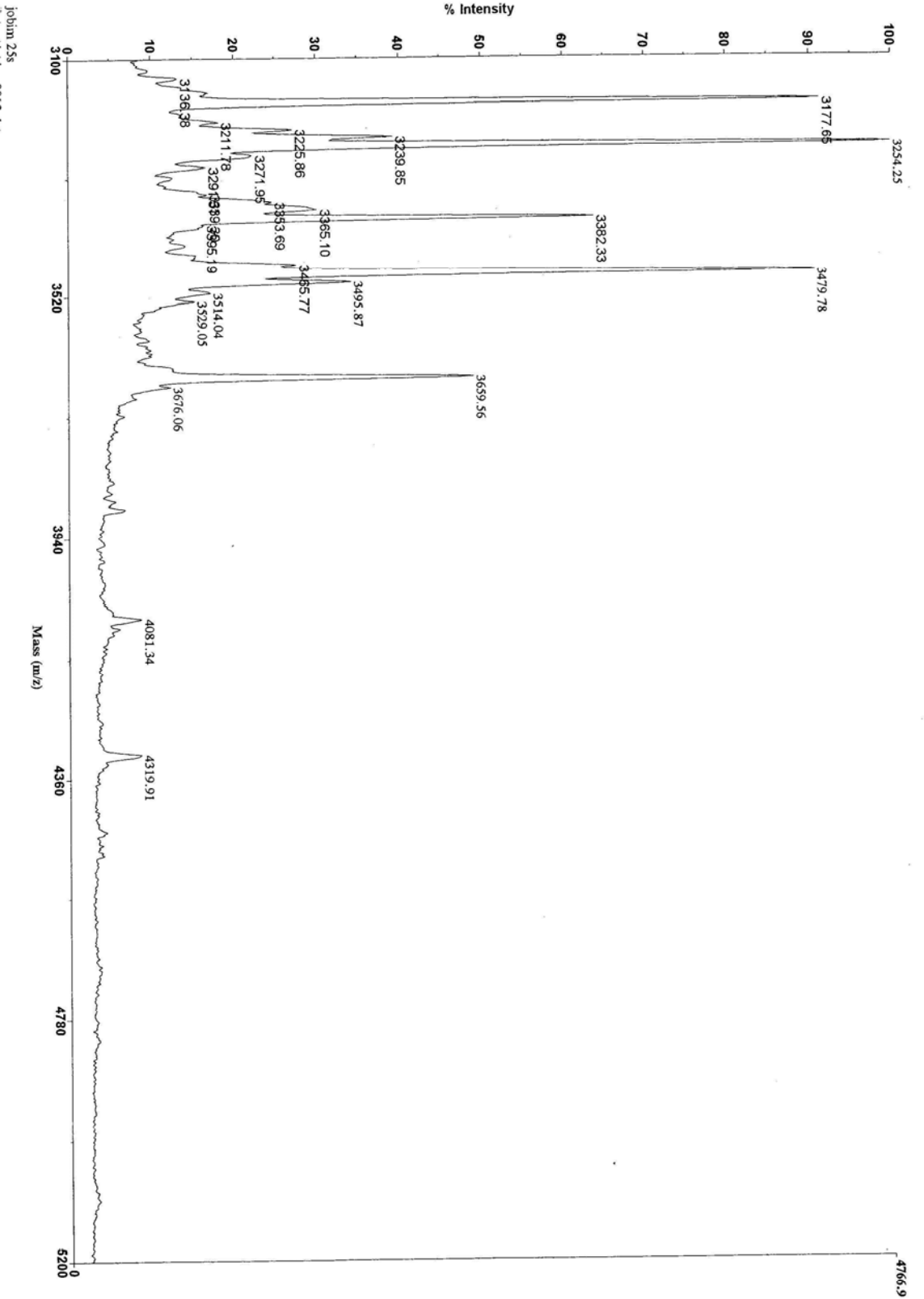
Voyager Spec #1 MC => SM19 => MC => MCIBP = 1548.4, 222071



Voyager Spec #1 MC => SM19 => MC => MC[BP = 1548.4, 222071



Voyager Spec #1 MC => SM19 => MC => MC[BP = 1548.4, 22207]



Jobin 255

APÊNDICE D

ExPASy - PeptideMass

<http://br.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass>

[ExPASy Home page](#)
 [Site Map](#)
 [Search ExPASy](#)
 [Contact us](#)
 [Proteomics tools](#)
 [Swiss-Prot](#)
 Search for

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExPASy and complete [ouonline survey!](#)

PeptideMass

The entered protein is: SP1_HORSE

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 1

All cysteines have been treated with Iodoacetamide to form carbamidomethyl-cysteine (Cys_CAM), with acrylamide adducts (Cys_PAM).

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 750 Dalton.

Using average masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as [M+H].

You have selected SP1_HORSE (P81121) from UniProtKB/Swiss-Prot:

Seminal plasma protein HSP-1

- Chain Seminal plasma protein HSP-1 at positions 1 - 120 [Theoretical pI: 8.14 / Mw (average mass): 13905.42]

mass	position	#MC	artif.	modification(s)	peptide sequence	
3550.8788	1-33	1			DLQTTGADHSATVNPQQLI MTKHSATVTPENK	
2983.3047	93-118	1		Cys_CAM: 93, 105	3097.4087	CTTDGSLFRISWCSVTPNYD HHGAWK
				Cys_PAM: 93, 105	3125.4623	
2485.7278	1-23	0			DLQTTGADHSATVNPQQLI MTK	
2463.7410	57-78	1		Cys_CAM: 58, 71	2577.8450	WCSLTGTYSGSWKYCAATDY AK
				Cys_PAM: 58, 71	2605.8986	
2268.5283	102-120	1		Cys_CAM: 105, 120	2382.6323	ISWCSVTPNYDHHGAWKYC
				Cys_PAM: 105, 120	2410.6859	
2246.4580	51-69	1		Cys_CAM: 58	2303.5100	TDSFYRWCSLTGTYSGSWK
				Cys_PAM: 58	2317.5368	
2111.3823	24-41	1		Cys_CAM: 34	2168.4343	HSATVTPENKCVFPFNYR
				Cys_PAM: 34	2182.4611	
2002.2135	102-118	0		Cys_CAM: 105	2059.2655	ISWCSVTPNYDHHGAWK
				Cys_PAM: 105	2073.2923	
1990.3013	70-86	1		Cys_CAM: 71, 79	2104.4053	YCAATDYAKCAFPFVYR
				Cys_PAM: 71, 79	2132.4589	
1723.9461	79-92	1		Cys_CAM: 79	1780.9981	CAFPFVYRGQTYDR
				Cys_PAM: 79	1795.0249	
1720.8537	87-101	1		Cys_CAM: 93	1777.9057	GQTYDRCTTDGSLFR
				Cys_PAM: 93	1791.9325	
1590.7067	45-56	1		Cys_CAM: 48	1647.7587	YYDCTRDSFYR
				Cys_PAM: 48	1661.7855	
1476.6460	57-69	0		Cys_CAM: 58	1533.6980	WCSLTGTYSGSWK
				Cys_PAM: 58	1547.7248	
1422.6467	34-44	1		Cys_CAM: 34	1479.6987	CVFPFNYRGYR
				Cys_PAM: 34	1493.7255	

1197.3101	42-50	1	Cys_CAM: 48	1254.3621	GYRYDCTR
			Cys_PAM: 48	1268.3889	
1084.1737	24-33	0			HSATVTPENK
1046.2313	34-41	0	Cys_CAM: 34	1103.2833	CVFPFNRYR
			Cys_PAM: 34	1117.3101	
1006.1177	70-78	0	Cys_CAM: 71	1063.1697	YCAATDYAK
			Cys_PAM: 71	1077.1965	
1003.2063	79-86	0	Cys_CAM: 79	1060.2583	CAFPFVYR
			Cys_PAM: 79	1074.2851	
1000.1139	93-101	0	Cys_CAM: 93	1057.1659	CTTDGSLFR
			Cys_PAM: 93	1071.1927	
820.8947	45-50	0	Cys_CAM: 48	877.9467	YYDCTR
			Cys_PAM: 48	891.9735	
788.8347	51-56	0			TDSFYR

100.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 750 Da):

```

10      20      30      40      50      60
DLQTTGADHS ATVNPQQQLT MTKHSATVTF ENKCVFPFNRYR GYRYDCTR TDSFYRWCSL
70      80      90     100     110     120
TGIYSGSWKY CAATDYAKCR FPFVYRQQTYY DRCTTDGSLFR KISWCSVTFEN YDHEGAWKYC
    
```

[Display the list of masses](#) in raw text format to be exported into an external application

[ExPASy Home page](#)

[Site Map](#)

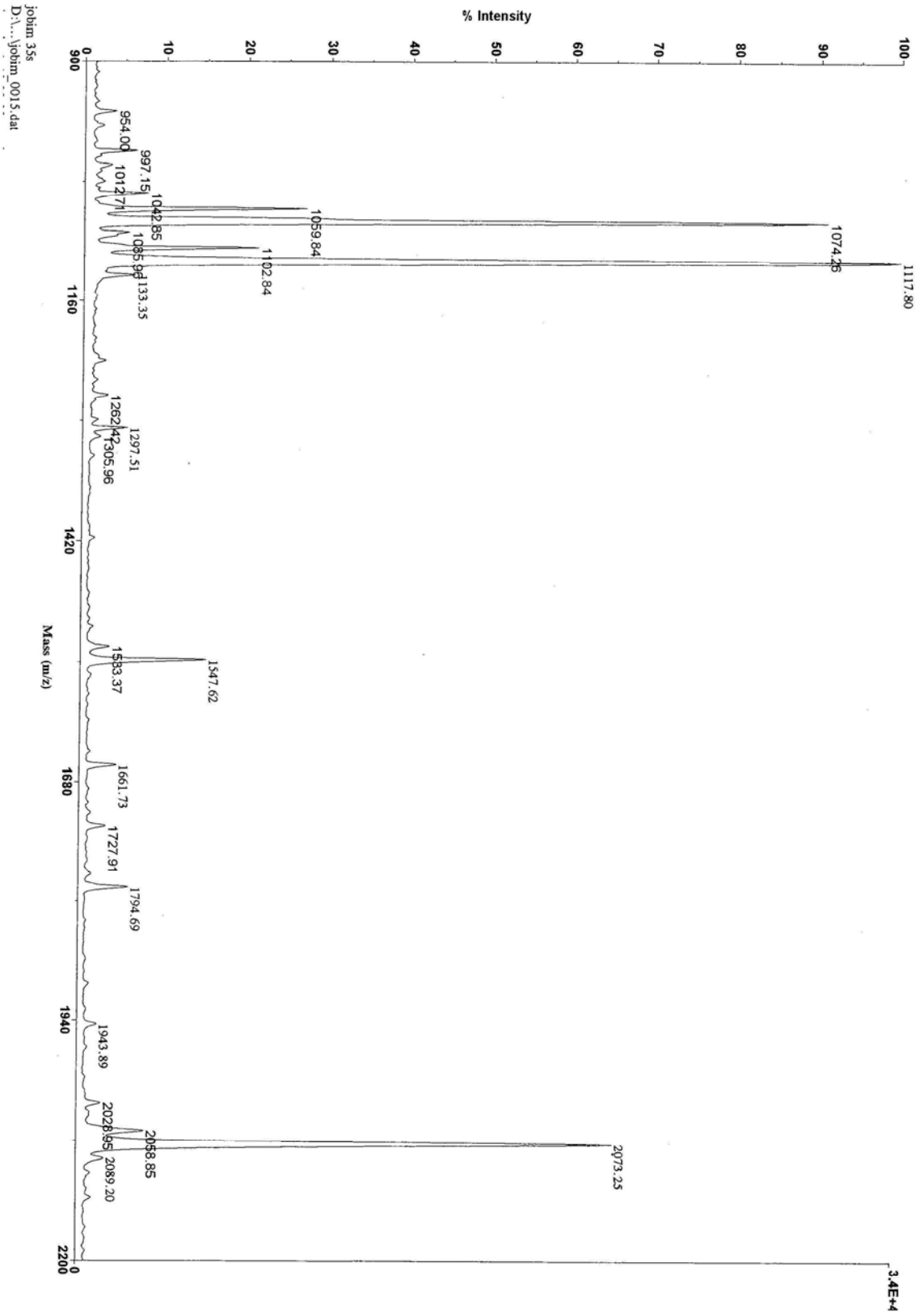
[Search ExPASy](#)

[Contact us](#)

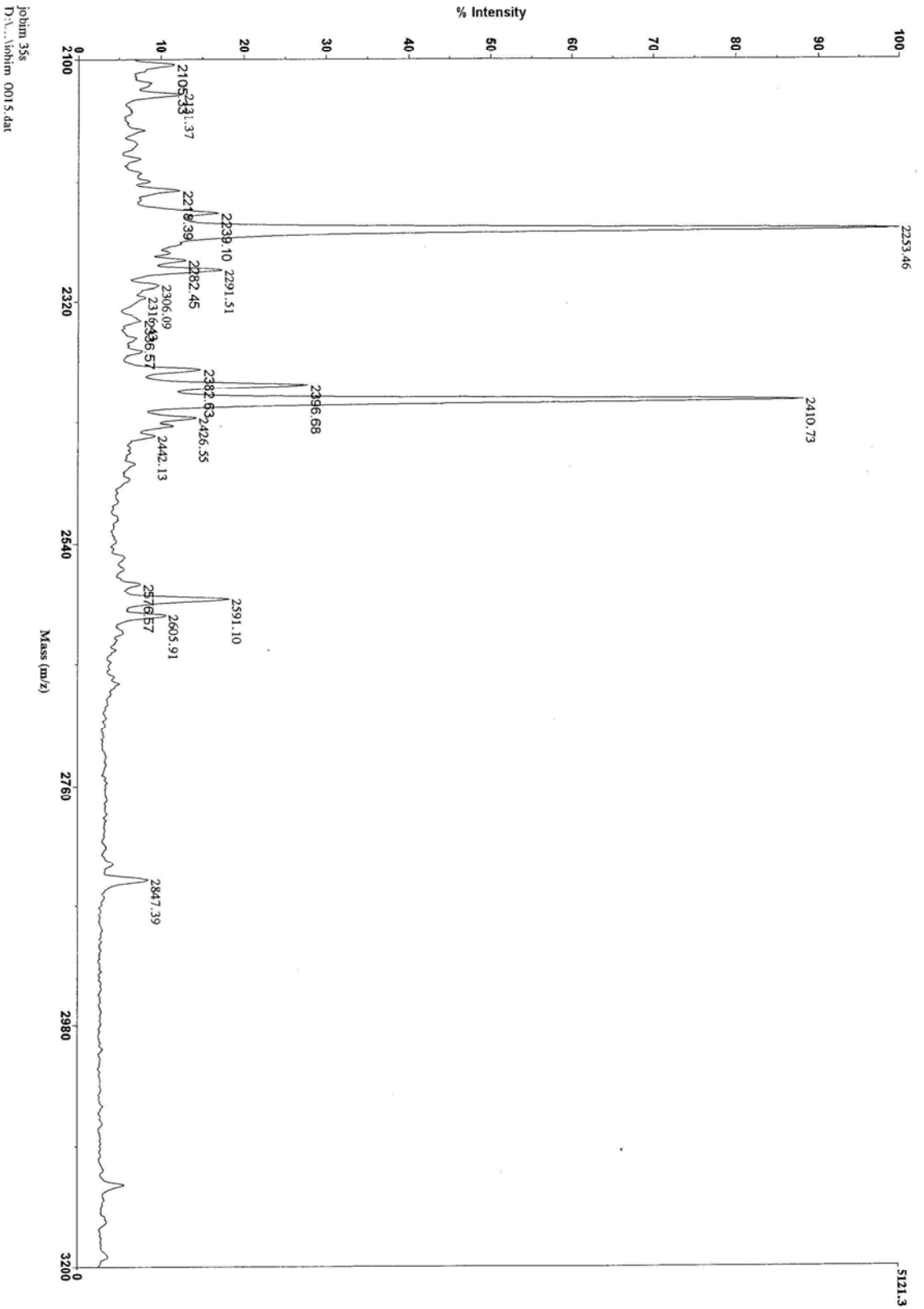
[Proteomics tools](#)

[Swiss-Prot](#)

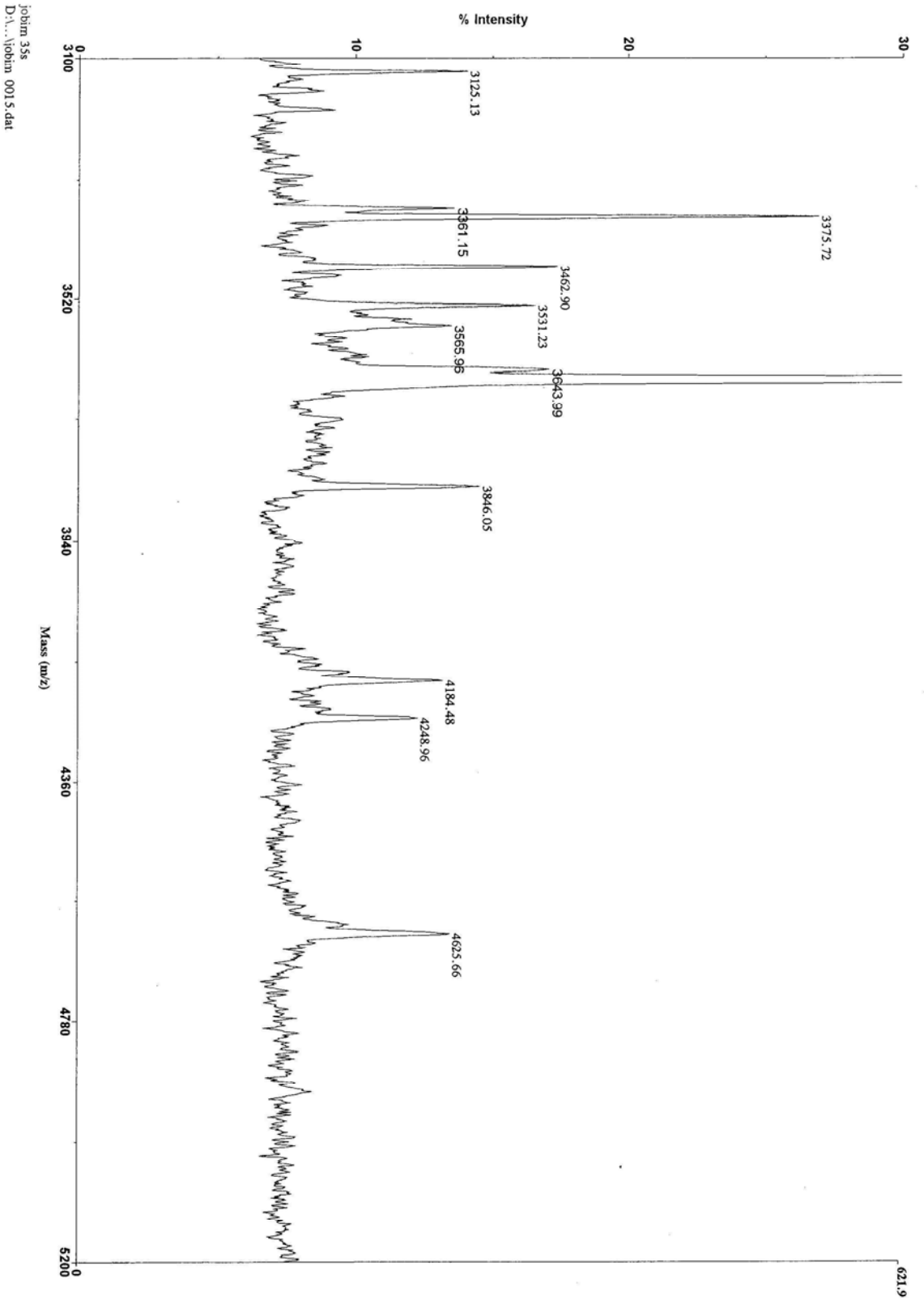
Voyager Spec #1 => SM19 => MClBP = 1117.0, 34292]



Voyager Spec #1 => SM19 => MC[BP = 1117.0, 34292]



Voyager Spec #1 => SM19 => MC[BP = 1117.0, 34292]



APÊNDICE E

User entered protein sequence

Page 1 of 3

[ExPASy Home page](#)
 [Site Map](#)
 [Search ExPASy](#)
 [Contact us](#)
 [Proteomics tools](#)
 [Swiss-Prot](#)
 Search [Swiss-Prot/TrEMBL](#) for [cris3_human](#)

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExPASy and complete our [online survey!](#)

PeptideMass

The entered sequence is:

```

      10      20      30      40      50      60
MAPCLGIFLI LVGACIFLQL DHVDGQQPI ATDHSPTRKP DNKCVFFIY QGRQHYDCTR
      70      80      90     100     110     120
ADSFYRWCSL TEKYSWKWKY CAAEDYAKCF FPFVYGRRTY HTCTTDGSVL LIPWCSVTPD
      130     140     150
YDLHGAWKYC ICPVYLTHGH ECDQAFETQV KIKIKKSQA

```

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 1

All cysteines have been treated with Iodoacetamide to form carbamidomethyl-cysteine (Cys_CAM), with acrylamide adducts (Cys_PAM).

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 750 Dalton.

Using average masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as [M+H]⁺.

The peptide masses from your sequence are:

[Theoretical pI: 7.51 / Mw (average mass): 18244.89]

mass	position	#MC	artif.modification(s)	peptide sequence
6048.8254	99-151	1	Cys_CAM: 103, 115, 130, 132, 142 Cys_PAM: 103, 115, 130, 132, 142	6334.0854 6404.2194 TYHTCTTDGSVLLIPWCSVT PDYDLHGAWKYCICPVYLTH GHECDQAFETQVK
4690.4500	1-43	1	Cys_CAM: 4, 15 Cys_PAM: 4, 15	4804.5540 4832.6076 MAPCLGIFLILVGACIFLQL DHVDGQQPIATDHSPTRKP DNK
4107.7927	1-38	0	Cys_CAM: 4, 15 Cys_PAM: 4, 15	4221.8967 4249.9503 MAPCLGIFLILVGACIFLQL DHVDGQQPIATDHSPTR
3595.0409	97-128	1	Cys_CAM: 103, 115 Cys_PAM: 103, 115	3709.1449 3737.1985 GRTYHTCTTDGSVLLIPWCS VTPDYDLHGAWK
3381.8015	99-128	0	Cys_CAM: 103, 115 Cys_PAM: 103, 115	3495.9055 3523.9591 TYHTCTTDGSVLLIPWCSVT PDYDLHGAWK
2814.2207	129-152	1	Cys_CAM: 130, 132, 142 Cys_PAM: 130, 132,	2985.3767 YICIPVYLTHGHECDQAFET QVKK

<http://ca.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>

4/28/2008

User entered protein sequence

Page 2 of 3

			142	3027.4571	
			Cys_CAM: 130, 132, 142	2857.2026	
2686.0466	129-151	0	Cys_PAM: 130, 132, 142	2899.2830	YCICPVYLTHGHECDQAFET QVK
			Cys_CAM: 44, 58	2248.5413	
2134.4373	44-60	1	Cys_PAM: 44, 58	2276.5949	CVFFPIYQGRQHYDCTR
			Cys_CAM: 81, 89	2208.5135	
2094.4095	80-96	1	Cys_PAM: 81, 89	2236.5671	YCAAEDYAKCFFPFVYR
			Cys_CAM: 44	1870.1788	
1813.1268	39-53	1	Cys_PAM: 44	1884.2056	KPDNKCVPFFIYQGR
			Cys_CAM: 58	1719.8282	
1662.7762	54-66	1	Cys_PAM: 58	1733.8550	QHYDCTRADSFYR
			Cys_CAM: 68	1663.8447	
1606.7927	61-73	1	Cys_PAM: 68	1677.8715	ADSFYRWCSLTEK
			Cys_CAM: 81	1405.5674	
1348.5154	78-88	1	Cys_PAM: 81	1419.5942	WKYCAAEDYAK
			Cys_CAM: 68	1359.5392	
1302.4872	67-77	1	Cys_PAM: 68	1373.5660	WCSLTEKYSYGK
			Cys_CAM: 89	1349.5955	
1292.5435	89-98	1	Cys_PAM: 89	1363.6223	CFFPFVYRGR
			Cys_CAM: 44	1287.5215	
1230.4695	44-53	0	Cys_PAM: 44	1301.5483	CVFFPIYQGR
			Cys_CAM: 89	1136.3561	
1079.3041	89-96	0	Cys_PAM: 89	1150.3829	CFFPFVYR
			Cys_CAM: 81	1091.1801	
1034.1281	80-88	0	Cys_PAM: 81	1105.2069	YCAAEDYAK
			Cys_CAM: 58	980.0425	
922.9905	54-60	0	Cys_PAM: 58	994.0693	QHYDCTR
			Cys_CAM: 68	924.0590	
867.0070	67-73	0	Cys_PAM: 68	938.0858	WCSLTEK
					YSGKWK
768.8902	74-79	1			ADSFYR
758.8084	61-66	0			

96.2% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 750 Da):

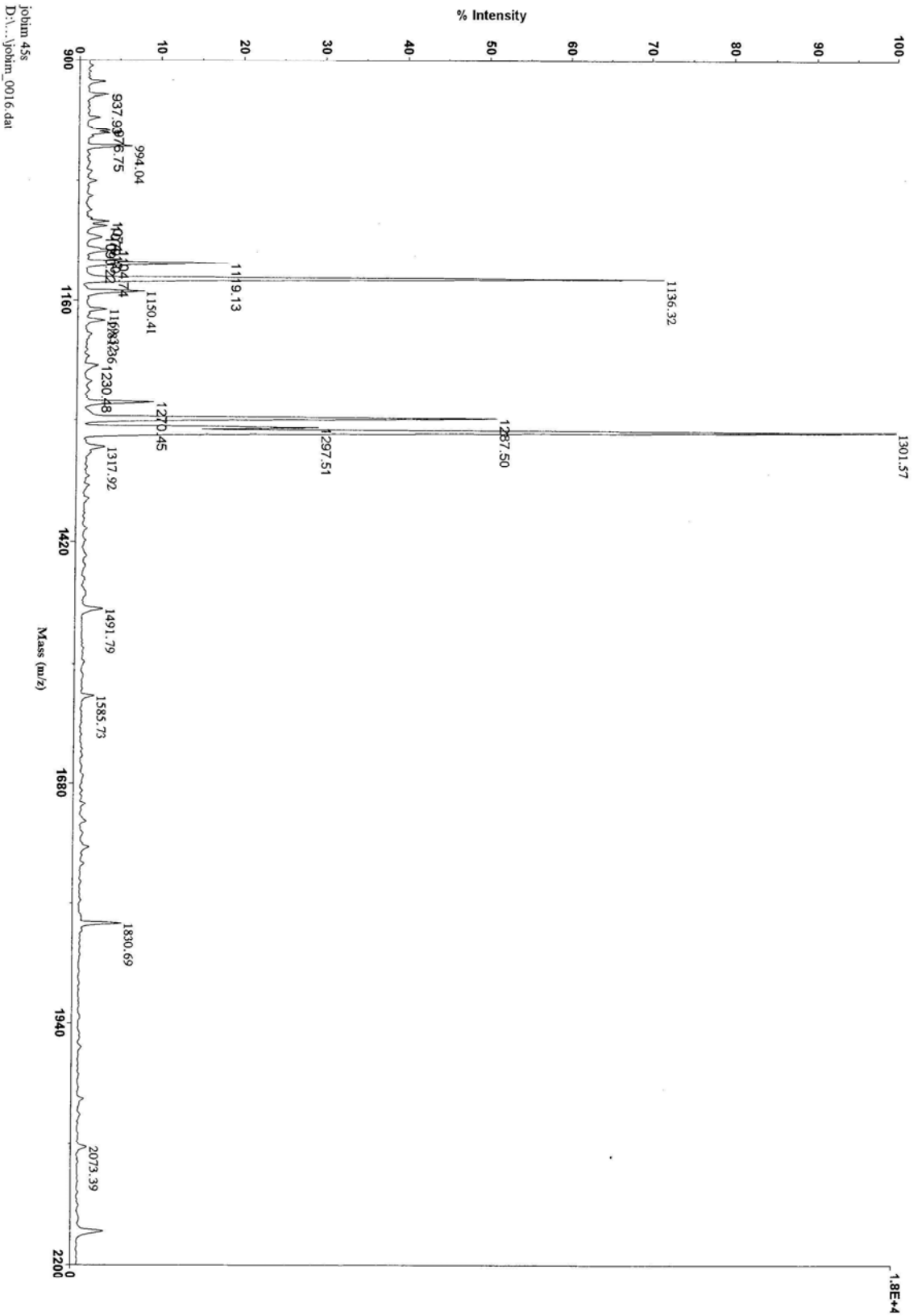
```

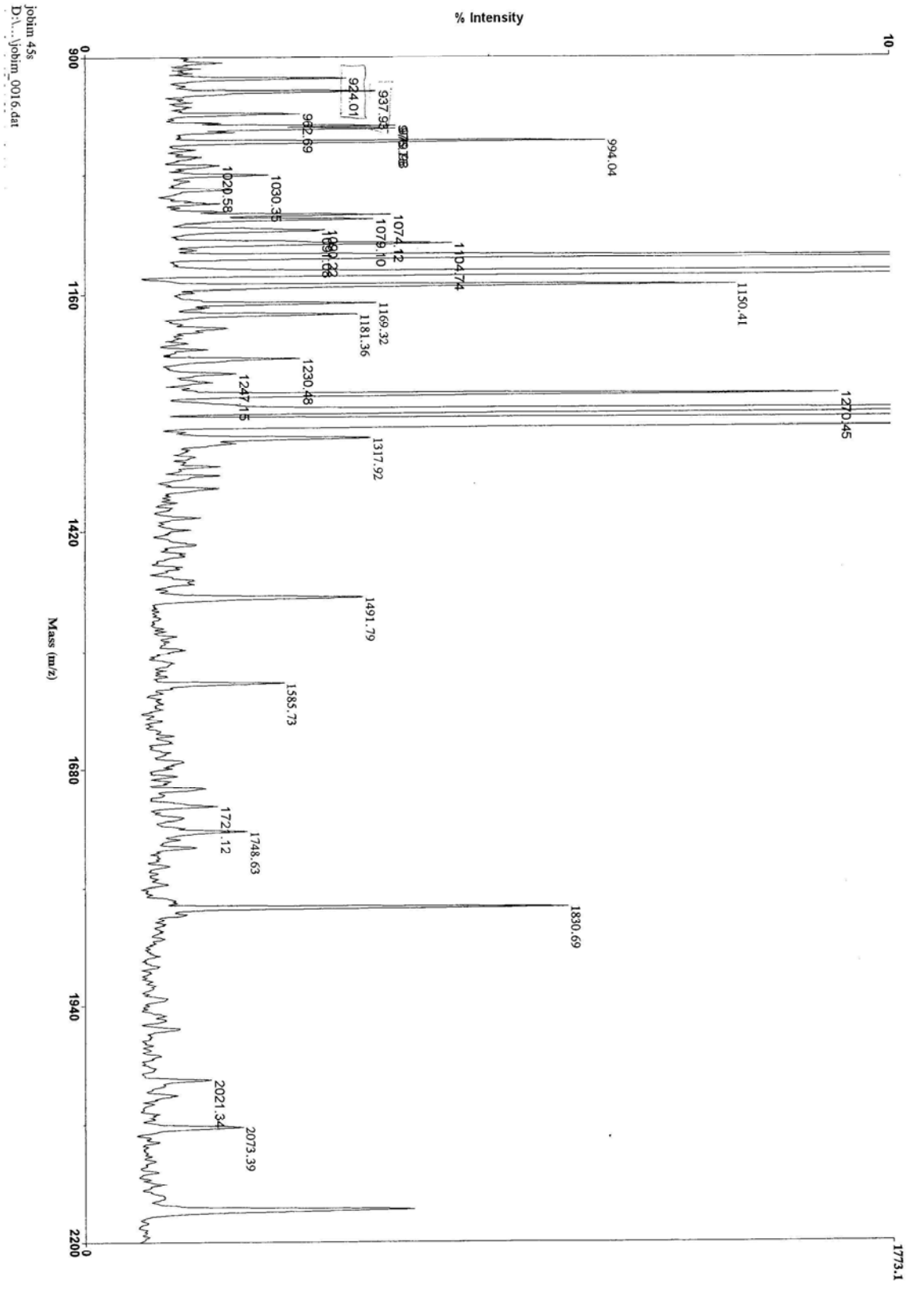
      10      20      30      40      50      60
MAPCLGIFLI LVGACIFLQL DHVGDGQQPI ATDHSPTKRP DNKCVFFPIY QGRQHYDCTR
      70      80      90     100     110     120
ADSFYRWCSL TEKYSYSGKWKY CAAEDYAKCF FPFVYRGRTY HTCTTDGGSVL LIPWCSVTPD
      130     140     150
YDLHGAWKYC ICPVYLTHGH ECDQAFETQV KKikksqa

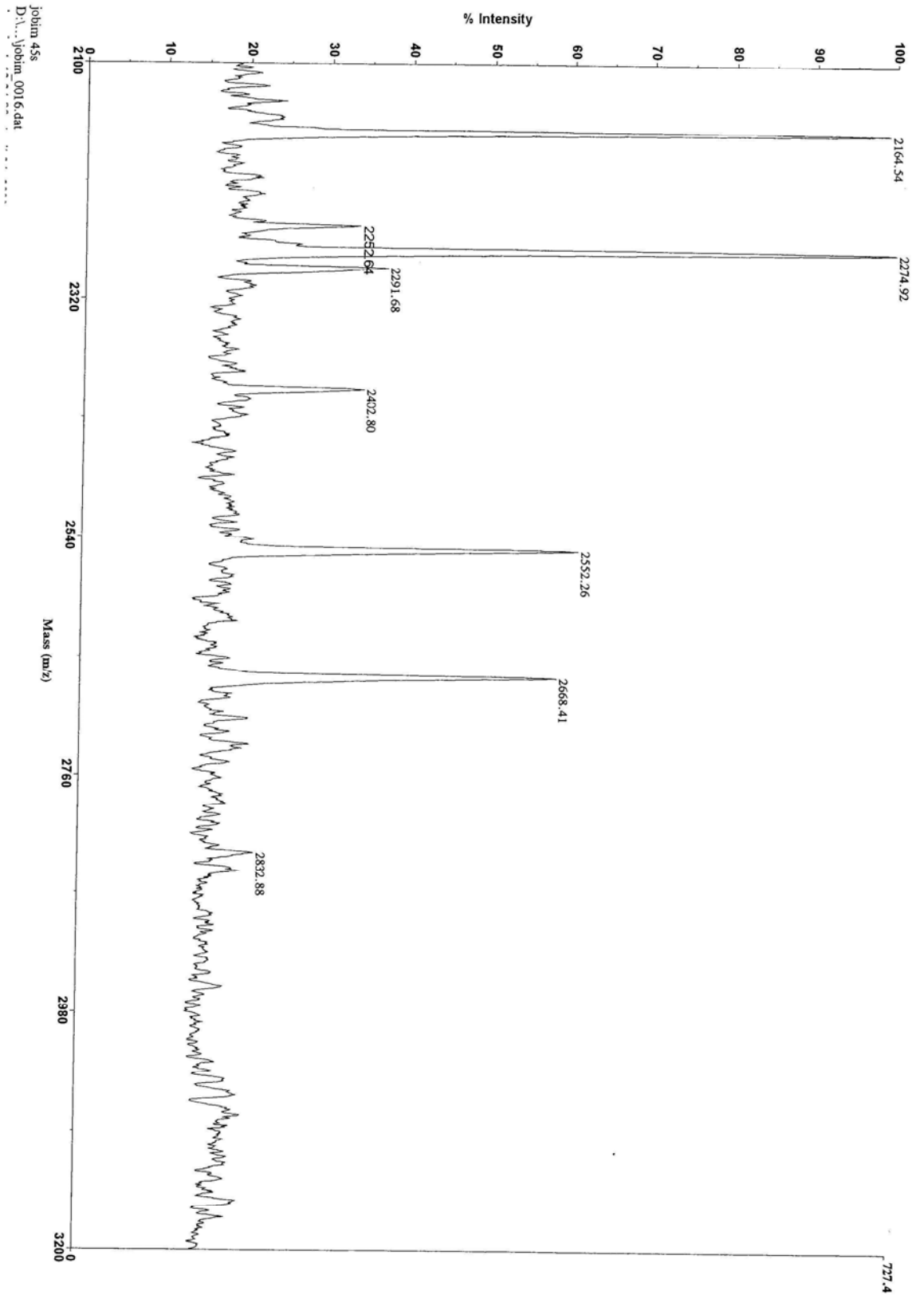
```

in raw text format to be exported into an external application

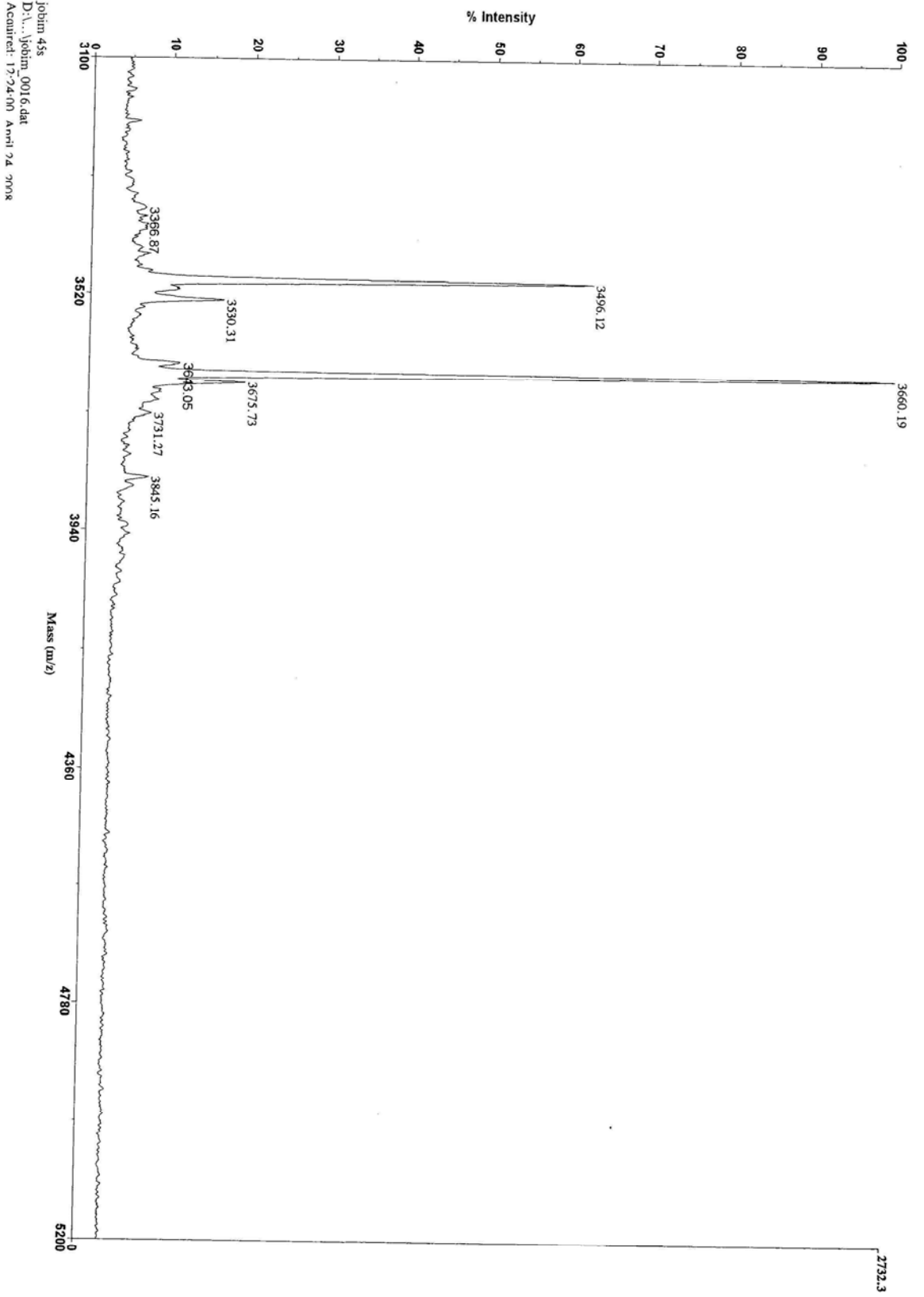
Voyager Spec #1 => SM19 => MC[BP = 1301.3, 17731]







Voyager Spec #1 => SM19 => MClBP = 1301.3, 17731]



APÊNDICE F

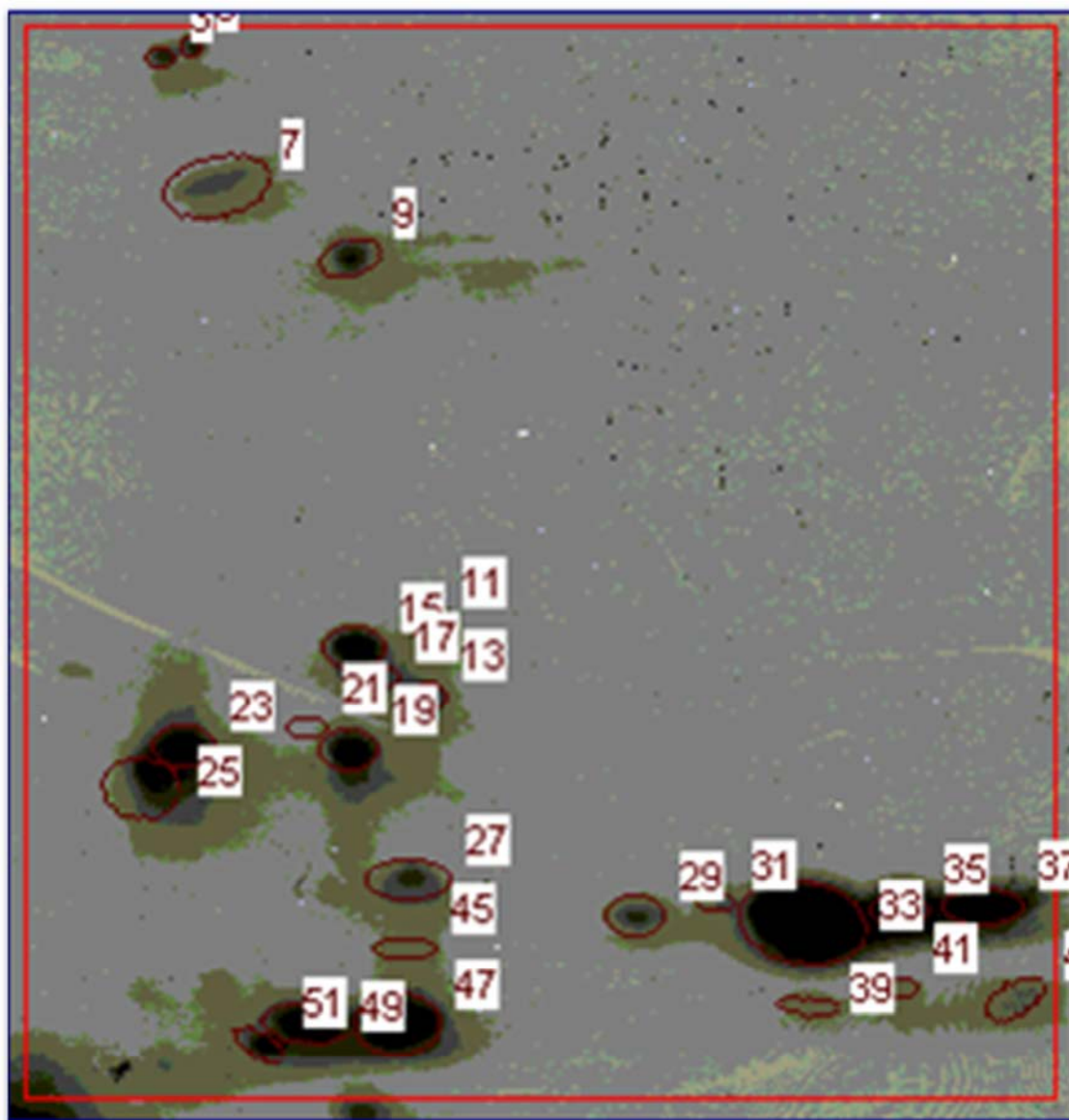


Imagem do gel de poliacrilamida a 12% após eletroforese bidimensional, gerada no programa de análise de imagem Optiquant. Os números indicam as 25 bandas proteínicas no plasma seminal equino que apresentaram diferença na congelabilidade do sêmen.

APÊNDICE G



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Theriogenology 76 (2011) 765–771

Theriogenology

www.theriojournal.com

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability

M.L.M. Jobim^{a,*}, C. Trein^a, H. Zirkler^b, R.M. Gregory^a, H. Sieme^c, R.C. Mattos^a

^a Department of Animal Medicine, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b National Soul Celle, Germany

^c Clinic for Horses - Reproductive Unit of Clinics, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

Received 15 September 2010; received in revised form 1 April 2011; accepted 9 April 2011

Abstract

The objective was to evaluate protein profiles of equine seminal plasma using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and to determine whether any of these proteins were related to semen freezability. Seminal plasma was collected from 10 stallions, of high and low semen freezability, housed at the State Stud of Lower Saxony, and routinely used in AI programs. Twenty-five protein spots were identified from the two-dimensional gel (12%), seven of which were present in all samples (all proteins were identified by MALDI-MS). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) has been used to generate ion images of samples in one or more mass-to-charge (m/z) values, providing the capability of mapping specific molecules to two-dimensional coordinates of the original sample. Of the 25 proteins identified, two spots had greater relative content ($P < 0.05$) in seminal plasma samples collected from stallions with high semen freezability: spot 5 (80–85 kDa, isoelectric point [pI] 7.54), identified as CRISP-3; and spot 45 (18.2 kDa, pI 5.0–5.2), identified as HSP-2. Conversely, protein content was greater ($P < 0.05$) in seminal plasma samples from stallions with low semen freezability: spot 7 (75.4 kDa, pI 6.9–7.4), identified as lactoferrin; spot 15 (26.7 kDa, pI 5.51), identified as kallikrein; spot 25 (25 kDa, pI 7.54), identified as CRISP-3; and spot 35 (13.9 kDa, pI 3.8–4.2), identified as HSP-1. In conclusion, there were differences in the seminal plasma protein profile from stallions with high and low semen freezability. Furthermore, CRISP-3 and HSP-2 were potential seminal plasma markers of high semen freezability.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: CRISP-3; HSP-1; HSP-2; Lactoferrin; Kallikrein; Two-dimensional electrophoresis

1. Introduction

Seminal plasma proteins are secretory products originating mainly from the epididymis and accessory sex glands. There is direct evidence that some of these proteins exert multiple effects on sperm function and the female genital tract [1]. Equine seminal proteins

were characterized during the last two decades. Amann et al. [2] reported equine seminal proteins with molecular masses between 13 and 122 kDa; based on SDS-PAGE, there was a low correlation between the presence of two proteins in the fresh ejaculate and subsequent postthaw motility. Brandon et al. [3] detected 14 proteins by two-dimensional electrophoresis. Some of these proteins were correlated with fertility of individual stallions [3].

Equine seminal proteins which constitute the majority of the total protein content of seminal plasma were

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33086121; fax: +55 51 33197305.

E-mail address: ism.jobim@ufrgs.br (M.L.M. Jobim).

characterized by Calvete et al. [4]. These isolated proteins, designated as horse seminal plasma proteins (HSP-1 to HSP-8), had low molecular masses (14 to 30 kDa). With exception of HSP-4, all had sperm-binding properties. Horse seminal plasma proteins 1 (HSP-1), 2 (HSP-2), and 5 to 8 (HSP-5 to HSP-8) likewise had heparin-binding ability, and were associated with the sperm surface, indicating a potential role in fertilization [1]. Horse seminal plasma proteins 1 (HSP-1) and 2 (HSP-2; recently, renamed SP-1 and SP-2, respectively [5]) were the most abundant proteins in equine seminal plasma, accounting for 70% to 80% of the total proteins. They belong to the seminal Fn-2 type proteins [6] and are equine orthologs to the major bovine heparin-binding proteins (BSP). Horse seminal plasma protein 3 (HSP-3) is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family [7]. Horse seminal plasma protein 4 (HSP-4) is related to a calcitonin gene-like product. Horse seminal plasma protein (HSP-5) cannot be related to other known proteins. Horse seminal plasma proteins 6 and 8 (HSP-6 and HSP-8) are isoforms of a protein, which belongs to the kallikrein-like protein family [1], whereas HSP-7 is the equine homolog of the boar spermadhesin Awn-1 [8].

The contribution of seminal plasma proteins to freezability was reported in males of several species, including the bull [9–12], ram [13,14], buffalo [15,16], and boar [17]. However, information on the proteins of equine seminal plasma and their relation with semen freezability are still limited. Furthermore, the protein profile of equine seminal plasma has not yet been related to semen freezability by two-dimensional gel polyacrylamide electrophoresis.

The objectives of the present study were to assess protein profiles of equine seminal plasma from stallions used in AI programs from the State Stud of Lower Saxony, Germany, using two-dimensional SDS-PAGE, and to determine whether these protein profiles were related to semen freezability.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and processing

Seminal plasma was obtained from 10 Hanoverian breeding sires from the State Stud of Lower Saxony. These stallions had proven normal fertility and were routinely used in AI programs. Stallions were maintained under similar handling and feeding conditions. They were allocated into two groups according to their historical records for semen freezability, high ($N = 5$) and low ($N = 5$), using data provided by the AI Center.

In the AI Center, the minimum standard progressive motility for frozen-thawed semen to be considered viable was 35%, based on a computerized sperm analyzing system (Stroemberg-Mika, Montreux, CH). Stallions with high semen freezability had more than 30% viable ejaculates after thawing. Conversely, stallions classified as low semen freezability had <30% viable post-thaw ejaculates.

Two ejaculates were collected by artificial vagina from each stallion. After removing a 2 mL sample for experimental purposes (see section 2.2. Electrophoresis), semen was frozen for 24 h [18] and then thawed. In postthaw semen, high freezability stallions averaged $63.0\% \pm 9.4$ progressive motility, 50.9 ± 7.8 μ /sec smoothed path velocity, 110.2 ± 16.7 μ /sec track velocity, and 42.4 ± 5.8 μ /sec straight line velocity. For low freezability stallions, postthaw averages were $33.9\% \pm 11.9$ progressive motility, 27.2 ± 8.2 μ /sec smoothed path velocity, 63.4 ± 19.3 μ /sec track velocity, and 22.2 ± 6.9 μ /sec straight line velocity. All end points differed significantly between the two groups.

A 2.0 mL aliquot of semen was centrifuged at 1500 X g for 15 to 20 min to obtain seminal plasma. The supernatant seminal plasma was transferred to cryovials for storage in liquid nitrogen and subsequent laboratory analysis. The same frozen samples were thawed, re-centrifuged at 10 000 X g for 60 min at 4 °C, and 50 μ L were taken from the supernatant and transferred to cryovials for storage at -70 °C. Protein concentration from each sample was assessed as described [19], using bovine serum albumin (1 mg/mL) as a standard.

2.2. Electrophoresis

Seminal plasma samples were subjected (in duplicate) to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE), as described by O'Farrel et al. [20], and modified by Rodnight et al. [21]. The sample solution for separation contained 9 mol/L urea, 12.5 mmol/L lysine, 7 mmol/L sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), 4% (vol/vol) Igepal, and 2% (vol/vol) 2-mercaptoethanol. Non-equilibrium pH-gradient electrophoresis (NEPHGE) was used for the first dimension in 3.5% polyacrylamide tube gels, according to methods previously described [22]. A mixture of ampholites pH 3.5 to 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) was added to the isoelectric focusing tube gels, to create a pH gradient. protein (60 μ g) from each sample was put into each tube and cytochrome C (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was used as the front-runner marker. The electrofocusing was performed at a constant volt-

age of 800 V for 90 min. Two NEPHGE rod gels were mounted as mirror images with the positive ends in the center, on one 2-D slab gel (12% polyacrylamide). The standards (Sigma Chemical) consisted of bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), α -lactalbumin (14.2 kDa), and protinin (6.5 kDa) that were added to the standard vial.

2.3. Protein staining

Gels were immersed in 0.15% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Chemical), 53% methanol, 7% acetic acid, and water, and were stained overnight. The gels were destained in a mixture of 53% methanol, 7% acetic acid, and water, with a minimum of five solution changes per gel.

2.4. Gel drying

Destained gels were equilibrated (for 2 h) in a mixture of 50% methanol, 1% glycerol, and water, then placed between two cellophane sheets until dry.

2.5. Image acquisition and analysis

After drying, gels were scanned (Hewlett-Packard 6100C scanner, São Paulo, SP, Brazil) and analyzed (Software Optiquant Acquisition & Analysis V. 02.00, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) to determine the relative protein content of the spots (expressed in pixels). The software created a histogram of all pixels in the image, defining the distribution of the pixels as a function of the intensity. The histogram then determined the color or level of gray used to display each pixel in the image. The relative protein content of the spots was expressed as relative percentage, considering 100% the total of the spots (in pixels) within a defined area (constant for all gels). Each protein spot was a percentage of the total. A numbering system was applied to assign each spot and the data were used to prepare a map of the proteins present. To match the analyzed protein spots and specific spots to equine seminal plasma, the approximate molecular weight and isoelectric point (pI) were used.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed using ANOVA, with $P < 0.05$ regarded as significant. The effects of semen freezability were tested with stallions grouped according to their semen freezability. The random effect of the stallions was tested within freezability group. The logarithm of the relative protein content was used as

the dependent variable. Statistical analysis was carried out using the General Linear Model procedures (Statistical Analysis System Version 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA.)

2.7. Protein identification

The identification of some protein spots of interest from 2-D gels was obtained by mass spectrometry. Gels spots were transferred to clean tubes, water was added to completely hydrate gels, and the plastic coating removed with clean forceps. Gel spots were prepared for digestion by washing twice with 100 μ L 0.05 mol/L Tris (pH 8.5) and 30% acetonitrile for 20 min (with shaking), then with 100% acetonitrile for 1 to 2 min. The gel pieces were dried for 30 min in a Speed-Vac concentrator (Thermo, Georgia, GA, USA).

Gels were digested by adding 0.06 μ g modified trypsin (sequencing grade, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) in 13 to 15 μ L 0.025 mol/L Tris, pH 8.5. The tubes were placed in a heating block at 32 °C and left overnight. Peptides were extracted with 2 \times 50 μ L 50% acetonitrile, 2% trifluoroacetic acid (TFA); the combined extracts were dried and resuspended in matrix solution. The latter was prepared by making a 10 mg/mL solution of 4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid in 50% acetonitrile, 0.1% TFA and adding two internal standards, angiotensin and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 7-38 peptide.

The dried digest was dissolved in 3 μ L matrix/standard solution and 0.5 μ L was spotted onto a sample plate. When the spot was completely dry, it was washed twice with water. Then, MALDI mass spectrometry analysis was performed on the digest using an Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) Voyager DE Pro mass spectrometer in linear mode.

Peptide masses were entered into search programs to search the NCBI and/or GenPept databases for a protein match. Programs used were ProFound (<http://vsites.unh.edu/ctbsp/paginicialis/profound.htm>) and MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>).

3. Results

The distribution of equine seminal plasma proteins is shown (Fig. 1). Image analysis software identified 25 protein spots on the air-dried gel. However, six ejaculates (two and four from stallions with low and high freezability, respectively), contained all 25 protein spots. No significant differences in relative content

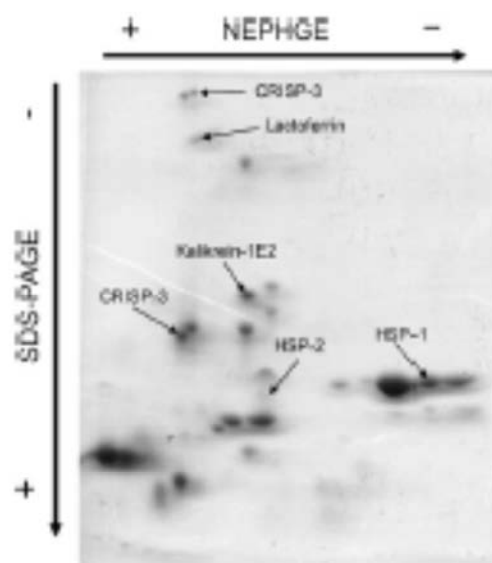


Fig. 1. Two-dimensional polyacrylamide electrophoretic gel of equine seminal plasma proteins. Two-dimensional 12% SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue. The arrow on the top shows the direction of the non-equilibrated pH gradient (NEPHGE) from basic end (+) to acid end (-) in the first dimension, whereas the arrow on the left shows the direction of the molecular weight. Proteins in equine seminal plasma, which differed between stallions with low versus high semen freezability, were identified.

were detected for each protein spot in the samples from the same stallion.

Of the 25 proteins, five spots were not present in the ejaculates of low freezability stallions: spots 13 (25–27 kDa), 17 (26–27 kDa), 29 (14–15 kDa), 43 (11–13 kDa), and 45 (18.2 kDa). Only spot 13 (25–27 kDa) was not present in the ejaculates of one high freezability stallion. The molecular weight, isoelectric point, and relative protein content (%) of these 25 polypeptides are shown (Table 1).

Six proteins in this study had quantitative difference between ejaculates from stallions of low versus high semen freezability: spots 5 (80–85 kDa, *pI* 7.54), 7 (75.4 kDa, *pI* 8.32), 15 (26.7 kDa, *pI* 5.51), 25 (25 kDa, *pI* 7.54), 35 (13.9 kDa, *pI* 8.14), and 45 (18.2 kDa, *pI* 5.0–5.2). The relative protein content (%) of these polypeptides is shown (Table 2).

Spots 5, 7, 15, 25, and 35 presented relative protein content means within two SD for all stallions. Spot 45 was absent in seminal plasma samples of only one stallion with low semen freezability. Nevertheless, when present, its relative protein content means were also within two SD. None of the other protein spots detected in this study had significant differences in relative protein content related to semen freezability.

Table 1

Molecular weight (MW), isoelectric point (*pI*), and relative protein content (%) of polypeptides in seminal plasma from 10 stallions.

Protein	MW (kDa)	<i>pI</i>	Mean \pm SD protein content (%)
	80–85	7.2–7.5	0.046 \pm 0.010
5	80–85	7.54	0.039 \pm 0.010
7	75.4	6.9–7.4	0.449 \pm 0.088
9	65–70	5.0–5.5	0.162 \pm 0.031
11	27–29	4.8–5.0	0.137 \pm 0.049
13	25–27	4.9–5.2	0.092 \pm 0.057
15	26.7	5.51	0.166 \pm 0.039
17	26–27	5.0–5.3	0.058 \pm 0.021
19	25–26	5.0–5.5	0.146 \pm 0.037
21	25–26	5.6–5.8	0.059 \pm 0.014
23	25–26	7.3–7.5	0.163 \pm 0.050
25	25	7.54	0.245 \pm 0.095
27	14–15	5.0–5.3	0.246 \pm 0.023
29	14–15	4.4–4.6	0.173 \pm 0.011
31	14–15	4.2–4.4	0.062 \pm 0.015
33	12–14	3.9–4.2	0.383 \pm 0.101
35	13.9	3.8–4.2	0.144 \pm 0.037
37	13–14	3.4–3.7	0.195 \pm 0.031
39	11–13	4.2–4.3	0.090 \pm 0.013
41	12–13	3.4–3.6	0.064 \pm 0.016
43	11–13	3.2–3.6	0.188 \pm 0.026
45	18.2	5.0–5.2	0.098 \pm 0.014
47	10–12	5.0–5.5	0.264 \pm 0.067
49	10–12	5.8–6.2	0.184 \pm 0.053
51	10–11	6.4–6.8	0.115 \pm 0.032

Two spots had higher relative content in seminal plasma samples collected from stallions with high semen freezability: spot 5 (80–85 kDa, *pI* 7.54) identified as CRISP-3, and spot 45 (18.2 kDa, *pI* 5.0–5.2) identified as HSP-2. Conversely, spot 7 (75.4 kDa, *pI* 6.9–7.4) identified as lactoferrin, spot 15 (26.7 kDa, *pI* 5.51) identified as kallikrein, spot 25 (25 kDa, *pI* 7.54) identified as CRISP-3, and spot 35 (13.9 kDa, *pI* 3.8–4.2) identified as HSP-1, had higher relative protein content in seminal plasma samples from stallions with low semen freezability (Fig. 1).

4. Discussion

Twenty-five protein spots with variable relative protein content and molecular weights ranging from 10 to 85 kDa and *pI* from 3.2 to 7.54 were detected in air-dried gels. However, none of these spots had significant variability among stallions.

Protein 5, molecular weight 80 to 85 kDa, *pI* 7.54, and protein 25, molecular weight 25 kDa, *pI* 7.54 were identified as CRISP-3. Protein spot 5 had higher relative protein content in samples from stallions in the high freezability group, whereas protein spot 25 had

Table 2
Mean \pm SD relative protein content (%) of polypeptides in equine seminal plasma with low versus high semen freezability.

Freezability	Protein spots					
	5	7	15	25	35	45
Low	0.036 \pm 0.010	0.479 \pm 0.053	0.178 \pm 0.031	0.279 \pm 0.036	0.155 \pm 0.035	0.092 \pm 0.005
High	0.042 \pm 0.011	0.420 \pm 0.105	0.154 \pm 0.03	0.214 \pm 0.102	0.134 \pm 0.037	0.103 \pm 0.018

For each protein spot, there was a difference ($P < 0.05$) between stallions with low versus high semen freezability.

significantly higher relative protein content in samples from stallions with low freezability.

Cystein-rich seminal plasma protein 3 (CRISP-3) is present in large amounts in the seminal plasma of stallions. This protein is expressed in the epididymis and throughout the rest of the equine genital tract, with the highest expression in the ampulla [7]. Based on the high expression of CRISP-3, we inferred that it may have an important function in equine reproduction. Cystein-rich seminal plasma protein 3 may contribute to the functions of seminal plasma in the female genital tract, although the role of CRISP proteins in equine fertilization awaits further investigation [1]. The CRISP gene expression pattern was corroborated by accompanying studies at the protein level, which detected proteins with slightly differing molecular masses along the equine male genital tract [1], which agrees with the present results.

Hamann et al. [23] identified 52 new CRISP-3 polymorphic sites in Hanoverian stallions. There were main differences between genotypes for the CRISP-3 c. +622G>A single nucleotide polymorphism (SNP), which led to an amino acid exchange from glutamine to lysine at position 208 of the CRISP-3 protein. Perhaps a nonconservative exchange from glutamic acid to lysine in this region of the equine CRISP-3 protein might indeed alter its protein-protein binding properties, which could subsequently affect male fertility. It can be hypothesized that the polymorphism within the equine CRISP-3 gene may affect the function of the protein.

Protein spot 7 (75.4 kDa, pI 6.9–7.4) was identified as lactoferrin. Lactoferrin is an iron-binding protein with a molecular mass of 80 kDa [24,25]. The physiological role of seminal lactoferrin remains unclear. Lactoferrin is known to be secreted by the epididymis, but not by the testis or vas efferens in stallions [26]. Transferrin (TF) which serves as a major iron-binding protein in serum, is also known to be present in seminal plasma, with its origin in Sertoli cells [27,28]. Lactoferrin and transferrin are homologous [25]. Buckett et al. [29] reported increased lactoferrin concentration in semen samples showing oligospermia and oligoasthe-

nospermia compared with normospermic samples in humans [29]. In humans and bulls, abnormal levels of transferrin in seminal plasma have been associated with testicular dysfunction and reduced fertility [30]. Considering its increased concentration in human semen samples showing oligospermia and oligoasthenospermia, and the presence of lactoferrin, quantitatively higher in stallions with low freezability semen, biological functions of this protein in the horse may be similar to those reported for humans.

Protein 35, molecular weight 13.9 kDa, pI 3.8 to 4.2 was identified as HSP-1, whereas protein 45, molecular weight 18.2 kDa, pI 5.0 to 5.2, was identified as HSP-2. Spot 35 (HSP-1) had significantly higher relative protein content in samples from stallions in the low freezability group. Conversely, spot 45 (HSP-2) had significantly higher relative protein content in samples from stallions with high freezability. Horse seminal plasma proteins 1 and 2 (HSP-1 and HSP-2), two BSP protein homologs from the equine seminal plasma, have been purified [6,30], and have phosphocholine, heparin, and gelatin binding properties [6,30]. All members of this family of proteins contain type II domains that seem to be responsible for these binding properties; their primary structure have 50% to 65% sequence similarity [6,31–34].

Horse seminal plasma protein 2 (HSP-2), with greater content in stallions with high freezability, was in agreement with Jobim et al. [11] who found a protein spot with 15 to 16 kDa, pI 4.7 to 5.2, with significantly higher relative protein content in samples from bulls in the high-freezability group. This protein was immunologically identified as bovine seminal plasma proteins (BSP) A1/A2 [35]. The BSP A1/A2 provided better protection for sperm membrane properties during semen freezing procedures [11]. Recently, Manjunath et al. [12] reported that egg yolk and milk caseins [10], which are also widely used to preserve semen, protect sperm functions by preventing major proteins of bull seminal plasma (BSP) proteins from binding to sperm, thereby preventing BSP protein-mediated stimulation of lipid loss from the sperm membrane. This interaction appeared to abolish the detrimental effect of BSP proteins

on the sperm membrane. As in the case of egg yolk, skimmed milk prevented binding of BSP proteins to sperm and reduced sperm lipid loss, while maintaining sperm motility and viability during storage. Whereas sperm protection by egg yolk involved sequestration of BSP proteins by low-density lipoproteins (LDLs) present in egg yolk (i.e., BSP protein-lipoprotein interaction), the protection afforded by skimmed milk did not involve participation of lipids or lipoproteins; in contrast, the casein micelles present in skimmed milk sequestered BSP proteins. Thus, sperm protection by milk may involve a BSP protein-casein micelle (protein-protein) interaction [10]. Perhaps the greater amount of HSP-2 in seminal plasma, as detected in samples from stallions with high freezability semen, had the same effect as BSP A1/A2 above mentioned.

Whereas HSP-2 proteins detected in this study had greater relative protein content in stallions with high freezability semen, HSP-1 had greater relative protein content in samples of stallions with low freezability semen. The two proteins are members of the same family, but HSP-1 protein has a different degree of glycosylation. Calvete et al. [6] reported that aggregation and/or degree of glycosylation of HSP-1 influenced heparin binding; this property may influence other functions of the protein.

The protein spot 15 (26.7 kDa, pI 5.51), which had greater relative protein content in samples from stallions in the low freezability group, was identified as kallikrein1. Prostate-specific kallikrein, a member of the serine proteases gene family, was initially discovered in semen and was the most useful serum marker for prostate cancer diagnosis and prognosis [36]. The serine protease purified from equine seminal plasma had extensive sequence homology with human prostate-specific antigen (PSA) [37]. Stallion prostate secreted kallikrein (HPK) appeared to represent the equine counterpart of human PSA. Stallion prostate-secreted kallikrein was purified from a reproductively active stallion and it has been reported that the level of PSA mRNA expression was increased by androgens [38]. The amino acid sequence of kallikrein had the highest (58% to 60%) level of similarity with human PSA, rhesus monkey PSA, and human prostate kallikrein (hK2) [37].

Kallikrein 1 (KLK1), a key component of the kallikrein-kinin system, originates from a locus on the long arm of chromosome 19 that contains several related serine endopeptidases. The biological role of these kallikrein-related peptidases is not clear, but emerging evidence suggests that they might be impor-

tant in several physiological systems, e.g., male reproduction, skin homeostasis, tooth enamel formation, and neural development and plasticity [39]. Phylogenetic analysis also revealed a kallikrein-related peptidase gene expressed in the horse prostate, considered to be equine PSA [40], was more closely related to KLK1 than to KLK3 [40]. Thus, it was not the equine KLK3/PSA, but a paralog [39].

The other polypeptides analyzed in equine seminal plasma did not have significant variation among seminal plasma samples from high and low semen freezability stallions. However, results obtained in this study should be interpreted with caution, because bound proteins, which could have been influenced by sperm concentration, were not considered.

In conclusion, there were significant differences in seminal plasma protein profiles between stallions with high versus low semen freezability. Furthermore, CRISP-3 and HSP-2 were potential seminal plasma markers of high semen freezability.

Acknowledgements

The authors are grateful to the State Stud of Lower Saxony, Germany, for support and supply of seminal plasma samples.

References

- [1] Töpfer-Petersen E, Madzar Ekhlaoui-Handriesser, Kirchhoff C, Loeb T, Sieme H. *Asian Reprod Sci* 2005;89:159–70.
- [2] Arzoo RP, Cristanelli MJ, Squires EL. Proteins in stallion seminal plasma. *J Reprod Fertil Suppl* 1985;35:113–20.
- [3] Brandon CI, Hoxmer GL, Caddle AB, Fayer-Hosken RA. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 1999;52:863–73.
- [4] Calvete JJ, Neman S, Mann K, Sarz L, Sieme H, Klag E, et al. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. *Reprod Domest Anim* 1994;29:411–26.
- [5] Ekhlaoui-Handriesser M, Schafar B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, et al. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module protein. *Mol Reprod Dev* 2005;70:45–57.
- [6] Calvete JJ, Mann K, Schafar W, Sarz L, Reinert M, Neman S, et al. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995;310:615–22.
- [7] Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Töpfer-Petersen E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim Biophys Acta* 1998;1387:206–16.
- [8] Reinert M, Calvete JJ, Sarz L, Mann K, Töpfer-Petersen E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem* 1996;242:636–40.

- [9] Roncioletta M, Moroni ESC, Franceschini PH, Ramos PRR. Characterization of the plasma seminal protein 26 kDa and their relationship with bull semen freezability [in Portuguese]. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFPR* 2000;28:323.
- [10] Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol Reprod* 2007;77:120–6.
- [11] Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 2004;61:255–66.
- [12] Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Spermatology* 2007;65:217–28.
- [13] Barrios B, Perez R, Gallego M, Tato A, Oueda J, Meino-Blasco T, et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 2000;63:1531–7.
- [14] Rebolloso AD, Sierra LN, Tarrayo AC, Loria AA, Denis SE, Ossa RB, et al. Fertility in hair sheep inseminated with frozen spermatozoa reconstituted with seminal plasma. *Rev Cient-Fac Cien Veter* 2007;17:73–6.
- [15] Hiron M, Harshan LP, Singh A, Aranganay MR, Arani Kumar S. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and *in vitro* fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Asian Reprod Sci* 2006;93:124–33.
- [16] Anadipour R, Alavi-Shorabani SM, Azizi Rezaei S, Armani MHK. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Asian Reprod Sci* 2007;102:308–13.
- [17] Casan I, Sanchez S, Hriz M, Pinart E, Buzualde E, Yeste M, et al. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology* 2009;72:930–48.
- [18] Martin JC, Klag E, Günzel AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fertil* 1979; Suppl.27:45–51.
- [19] Lowry OH, Rosebrough WJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [20] O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 1977;12:1133–42.
- [21] Rodnight R, Zamani R, Twoodale A. An investigation of experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. *J Neurosci Methods* 1988;24:27–38.
- [22] Lenz G, Mancuso L, Gotardo S, Achaval M, Salbego C, Rodnight R. Temporal profiles of the *in vitro* phosphorylation rate and immunoccontent of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) after kainic acid induced lesions in area CA1 of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. *Brain Res* 1997;764:188–96.
- [23] Harrath H, Jaffe R, Sieme H, Mertens U, Topfer-Petersen E, Drost O, et al. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Asian Genet* 2007;38:259–64.
- [24] Aisen P, Leibman A. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochim Biophys Acta* 1972;257:314–23.
- [25] Baldwin GS. Comparison of transferrin sequences from different species. *Comp Biochem Physiol B* 1993;106:203–18.
- [26] Foucaucourt S, Motayer S, Locatelli A, Duchoux F, Duchoux J. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 2000;62:1790–1803.
- [27] Gilmore RR, Senger PL, Sylvester SR, Griewold MD. Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. *Biol Reprod* 1990;43:151–7.
- [28] Holmes SD, Lipshultz LI, Smith RC. Transferrin and gonadal dysfunction in man. *Fertil Steril* 1982;38:600–4.
- [29] Hockett WM, Luckan MJ, Garvani MR, Aird IA, Lewis-Jones DI. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. *J Androl* 1997;18:302–4.
- [30] Zalata A, Hafer T, Schoonjan F, Coenhair F. The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 1996;11:761–4.
- [31] Calvete JJ, Ráida M, Gertzel M, Urbauke C, Saez L, Topfer-Petersen E. Isolation and characterization of heparin- and phosphotyrosine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pBI. *FEBS Lett* 1997; 407:201–6.
- [32] Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acid proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 3:685–92.
- [33] Scidab NG, Manjunath P, Rochmorent TJ, Sairam MR, Chretien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem J* 1987;243:195–203.
- [34] Saleis D, Méraud M, Paquette Y, Manjunath P. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylethanolamine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod* 1999;61:288–97.
- [35] Mattos RC, Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Wald VB, Heen AP, et al. BSP A1/A2: A seminal plasma marker of high semen freezability [abstract]. 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil 2004;2:462.
- [36] Barry MJ. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med* 2001;344: 1373–7.
- [37] Carvalho AL, Saez L, Baretano D, Romero A, Calvete JJ, Rentele MJ. Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: a homologue of human PSA. *J Mol Biol* 2002;322:325–37.
- [38] Henttu P, Vihko P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. *Ann Med* 1994;26:157–64.
- [39] Landwall A, Brattlund M. Kallikrein-related peptidases. *Rev Cell Mol Life Sci* 2008;65:2019–38.
- [40] Olsson AY, Lilja H, Landwall A. Tissue-specific evolution of glandular kallikrein genes and identification of a progenitor of prostate-specific antigen. *Genomics* 2004;84:147–56.