

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

**HSP-1 E HSP-2 NO PLASMA SEMINAL EQUINO: EFEITOS DA  
SAZONALIDADE NA CONCENTRAÇÃO E RELAÇÃO COM A  
FERTILIDADE DE GARANHÕES**

**Autora: Luisa Almeida Deragon Garcia**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

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

**HSP-1 E HSP-2 NO PLASMA SEMINAL EQUINO: EFEITOS DA  
SAZONALIDADE NA CONCENTRAÇÃO E RELAÇÃO COM A  
FERTILIDADE DE GARANHÕES**

**Autora: Luisa Almeida Deragon Garcia**

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

**Orientadora: Maria Inês  
Mascarenhas Jobim**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

### CIP - Catalogação na Publicação

Almeida Deragon Garcia, Luisa  
HSP-1 E HSP-2 NO PLASMA SEMINAL EQUINO: EFEITOS  
DA SAZONALIDADE NA CONCENTRAÇÃO E RELAÇÃO COM A  
FERTILIDADE DE GARANHÕES / Luisa Almeida Deragon  
Garcia. -- 2014.  
58 f.

Orientador: Maria Ines Mascarenhas Jobim.  
Coorientador: Claudio Correa Natalini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,  
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Reprodução Equina. 2. Garanhão. 3. Proteínas do  
Plasma Seminal . I. Mascarenhas Jobim, Maria Ines,  
orient. II. Correa Natalini, Claudio, coorient. III.  
Título.

LUISA ALMEIDA DERAGON GARCIA

**HSP-1 E HSP-2 NO PLASMA SEMINAL EQUINO: EFEITOS DA SAZONALIDADE NA CONCENTRAÇÃO E RELAÇÃO COM A FERTILIDADE DE GARANHÕES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos, na área de Reprodução Equina, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim.

APROVADO POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim

Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Nelson Kretzmann

Membro da Comissão

---

Dra. Anita Mylus Pimentel

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que me foram concedidas e pela força interna para seguir em frente.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim, pela orientação, paciência e apoio fundamentais durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Claudio Correa Natalini, pela disposição e colaboração na execução deste projeto.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos, pelo auxílio e suporte essenciais a esta pesquisa.

Ao Dr. Juan Jose Calvete, por gentilmente nos ceder amostras purificadas das proteínas estudadas.

A Ma. Priscila Serpa, pela dedicação e ajuda despendidas na realização de diversas etapas imprescindíveis deste experimento.

Ao Me. Enio Brito, pela ajuda e suporte durante o decorrer do trabalho.

A todos os estagiários e colegas do REPROLAB, que de alguma forma contribuíram não só para o desenvolvimento do projeto mas também para o meu crescimento pessoal durante essa etapa da minha vida.

A Dra. Caroline Wolf, pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório.

A todos os proprietários, pela confiança em nos ceder os animais para coleta de amostras de plasma seminal.

Ao meu namorado, Luiz Felipe dos Santos, pelo amor e carinho, e por acreditar em mim.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e apoio sempre, em todos os momentos.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figure 1</b> HSP-1/2 (n = 39 ejaculates) and total protein (n = 42 ejaculates) concentration (mean $\pm$ SD) from stallion with good and poor fertility.....	33
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1</b> HSP-1/2 concentration (mg/mL, mean $\pm$ SE) in the first and second ejaculate from stallions with good (n = 6) and poor (n = 5) fertility measured in the non-breeding and breeding season.....	34
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSP	Proteína de ligação ao espermatozoide
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CRISP	Proteínas Secretadas Ricas em Cisteína
Fn-II	Proteínas que contém Domínio Fibronectina Tipo II
HSP	Proteína do Plasma Seminal Equino
INHBA	Inibina Beta A
nm	Nanômetro
OPN	Osteopontina
PS	Plasma Seminal
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography



## RESUMO

Proteínas presentes no plasma seminal (PS) vêm sendo estudadas em relação a níveis reprodutivos de fertilidade ou infertilidade, em várias espécies de mamíferos, particularmente em animais domésticos. As proteínas do plasma seminal equino 1 (HSP-1) e 2 (HSP-2) são as proteínas mais abundantes nesta espécie. O objetivo deste estudo foi investigar a concentração das proteínas HSP-1/2 presentes no plasma seminal bem como o conteúdo de proteína total, em garanhões adultos durante a estação reprodutiva e fora dela, para determinar se essas concentrações estão relacionadas com a fertilidade. O PS foi obtido a partir de 42 ejaculados de 11 garanhões adultos (3-25 anos). Os animais foram alocados em dois grupos (alta e baixa fertilidade) de acordo com as taxas de prenhez de éguas e dos dados de viabilidade do sêmen avaliados no primeiro dia de coleta. As concentrações das HSP-1/2 (mg/mL) foram medidas e analisadas por um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência utilizando uma coluna UHPLC. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na concentração de proteínas totais e das proteínas HSP-1/2 (mg/mL, média  $\pm$  DP) entre os ejaculados de animais de alta e baixa fertilidade. Não houve diferença na concentração das HSP-1/2 no primeiro e segundo ejaculados de garanhões de alta fertilidade, tanto dentro ou fora da estação reprodutiva. O PS de animais classificados no grupo de baixa fertilidade apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na concentração das HSP-1/2 entre o primeiro e segundo ejaculado, tanto no período da estação reprodutiva quanto fora dele. Em conclusão, a concentração das principais proteínas do plasma seminal em garanhões, as HSP-1/2, foi maior em ejaculados de garanhões de baixa fertilidade, o que não parece ser influenciado pelo período de coleta, podendo assim, ser indicada como biomarcador da baixa fertilidade em garanhões.

**Palavras-chave:** garanhão, UHPLC, temporada de monta, plasma seminal

## ABSTRACT

Seminal plasma (SP) proteins have been assessed in relation to reproductive fertility levels or infertility, in several species of mammals, particularly domestic animals. Horse seminal plasma proteins 1 (HSP-1) and 2 (HSP-2) are the most abundant proteins in equine seminal plasma. The aim of this study was to investigate in adult stallions the concentrations of seminal plasma HSP-1/2 and total protein in the breeding season and non-breeding season and to determine if these concentrations were related with fertility. SP was obtained from 42 ejaculates of 11 adult stallions (3-25 yrs). Stallions were allocated into two groups (good and poor fertility) according to pregnancy rates of mares, and to their semen viability data in the first collection day. Seminal plasma HSP-1/2 concentrations (mg/mL) were measured and analyzed by an Ultra High Performance Liquid Chromatography using a UHPLC column. There were significant differences ( $P<0.05$ ) in total protein and HSP-1/2 concentration (mg/mL, mean  $\pm$  SD) in the ejaculates from good and poor fertility stallions. The HSP-1/2 concentration did not show differences in the first and second ejaculates of good fertility stallions in both the non-breeding and breeding season. SP of stallions classified as poor fertility showed significant difference ( $P<0.05$ ) in HSP-1/2 concentration between the first and second ejaculate in both the non-breeding and breeding season. In conclusion, the concentration of the major proteins of stallion seminal plasma HSP-1/2 was higher in ejaculates from stallions with poor fertility, is not influenced by the season and could serve as biomarker for poor fertility in stallions.

**Key words:** stallion, UHPLC, breeding season, seminal plasma

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>O Plasma Seminal</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Proteínas do Plasma Seminal</b> .....	13
2.2.1	As Proteínas HSP .....	15
2.2.2	Outras Proteínas do Plasma Seminal .....	18
<b>2.3</b>	<b>A Concentração de Proteína Total</b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>A Cromatografia</b> .....	19
<b>2.5</b>	<b>A Fertilidade</b> .....	23
<b>3</b>	<b>ARTIGO: Horse Seminal Plasma Proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: A possible marker for poor fertility?</b> .....	27
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	38
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39
	<b>APÊNDICE A – Artigo aceito para publicação no periódico Pferdeheilkunde</b> ..	555

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que causam baixo índice de produtividade na equinocultura, os que concernem ao macho se revestem de prioridade. Sabe-se que o garanhão apresenta importância relevante na multiplicação do rebanho, uma vez que na monta natural é capaz de servir um número significativo de éguas e, através da inseminação artificial este número pode elevar-se muito. Logo, selecionar reprodutores superiores quanto à qualidade e fertilidade do sêmen reveste-se da maior relevância econômica.

Um dos pontos de estrangulamento da reprodução equina é a frequência com que são encontrados garanhões selecionados quanto aos aspectos do desempenho, além da conformação e que, entretanto, demonstram dificuldade na obtenção de índices adequados de fertilidade, apesar destes animais apresentarem quadros espermáticos fisiológicos quanto aos aspectos físicos e morfológicos.

Considera-se que a taxa de prenhez de cada reprodutor é um dos principais indicadores do seu desempenho reprodutivo, mas esta informação torna-se disponível somente quando o animal já se encontra em fase reprodutiva. Portanto, a expectativa de se dispor de marcadores ou parâmetros que auxiliem a indicação do potencial reprodutivo do animal tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas. Parâmetros como motilidade e morfologia espermática são comumente usados para avaliar o potencial da capacidade fecundante de amostras de sêmen, mas ainda apresentam limitada relação com os índices de fertilidade *in vivo* dos animais. A existência de reprodutores de baixa fertilidade com parâmetros aparentemente normais de qualidade espermática constitui-se em importante observação e tem estimulado trabalhos que busquem uma explicação para esta ocorrência, portanto testes mais precisos necessitam ser desenvolvidos para avaliação dos reprodutores.

A seleção de garanhões férteis ou a predição de sua fertilidade utilizando biomarcadores é de extrema importância ao futuro reprodutivo desses animais. Recentemente, pesquisas têm sido focadas na identificação de marcadores para fertilidade a nível genômico ou proteômico para determinadas características de interesse zootécnico, o que poderá contribuir significativamente na escolha de animais geneticamente superiores.

Conhecer os fatores que interferem na fertilidade do sêmen se reveste de grande importância, e realizar uma seleção precoce e acurada de garanhões que serão futuros

reprodutores permitirá a redução dos custos envolvidos com a manutenção de animais não aptos à reprodução, justificando plenamente esta busca.

Assim, a pesquisa relatada nesta dissertação teve como objetivos avaliar a concentração das proteínas totais e das proteínas HSP-1 e HSP-2 do plasma seminal de equinos, na estação e fora da estação reprodutiva e verificar a relação destas concentrações com a fertilidade dos garanhões.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O Plasma Seminal

O plasma seminal é o 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). Variações na composição do plasma seminal de diferentes machos têm sido relacionadas a diferentes índices de fertilidade (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993; BELLIN; HAWKINS; AX, 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).

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 compõe 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 até os 16 dias no ovino, e no equino 7,5-11 dias (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 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).

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) e está ainda envolvido em diversas funções espermáticas e eventos que precedem a fertilização (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

Além das variações entre indivíduos e entre ejaculados, foram demonstradas variações entre frações de plasma seminal em um ejaculado (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; KATILA; KLUG, 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).

Conforme mencionado anteriormente, 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), família das espermadesinas e as proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II (Fn-II).

## 2.2 Proteínas do Plasma Seminal

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

A função das proteínas CRISPs na fertilização foi bem estudada 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-ovócito através dos sítios de ligação da proteína a sítios

complementares na superfície do ovócito (CUASNICÚ *et al.*, 2001), entretanto não participa nos eventos da ativação do ovócito (BUSSO *et al.*, 2003). A análise da função estrutural indicou que os padrões corretos das pontes dissulfeto com a molécula é crucial para a realização desta função (ELLERMAN *et al.*, 2002).

A CRISP2 (TPX1) está envolvida no desenvolvimento das espermátides, sendo esta proteína uma das responsáveis pela aderência destas células às células de Sertoli (MAEDA; NISHIDA; NAKANISHI, 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).

A proteína CRISP no espermatozoide equino localiza-se nas regiões equatorial, pós-acrossomal bem como na peça intermediária. Sua associação à superfície espermática tem início na região do corpo do epidídimo (SCHAMBONY *et al.*, 1998). 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, este número de moléculas da CRISPs mostrou-se diretamente correlacionado à fertilidade individual de garanhões (REINEKE *et al.*, 1999).

As espermadesinas 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; EINSPANIER; SCHEIT, 1992; TEDESCHI *et al.*, 2000), no ovino (espermadesina 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. Nesta espécie, as espermadesinas representam mais de 90% das proteínas do plasma seminal.

As espermadesinas 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 (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005).



HSP-7 é a espermadesina 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. 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; HOSHIBA; SINOWATZ, 1998).

A família de proteínas que contém o domínio Fn-II, são caracterizadas pela presença de dois módulos fibronectina tipo II, também denominados domínios BB'. Foram encontradas em várias espécies animais, sendo mais abundantes no bovino (BSP; MANJUNATH; SAIRAM, 1987), no caprino (VILLEMURE; LAZURE; MANJUNATH, 2003), bizonte (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.*, 1997). Foi identificado um grupo de proteínas 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).

### 2.2.1 As Proteínas HSP

A caracterização estrutural da HSP-1 equina mostrou que ela é uma proteína que contém o domínio Fn-II e pertence ao tipo AA'BB' 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.*, 2005), e tanto a EQ-12 como as HSP-1 e HSP-2 são associadas à superfície espermática durante o trânsito epididimário e na ejaculação, e ambas estão presentes no espermatozoide ejaculado.

HSP-1 e HSP-2 (recentemente, denominadas SP-1 e SP-2; EKHLASI-

HUNDRIESER *et al.*, 2005) 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 bovino (BSP), que estão envolvidas na capacitação espermática (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005).

Na ejaculação, as proteínas que contêm o domínio Fn-II, se unem ao espermatozoide mediante interações específicas com os resíduos de colina dos fosfolípidios da membrana do espermatozoide (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; MÜLLER *et al.*, 1998), mediando a capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolípidios (THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH, 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; WINER; AX, 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; WINER; AX, 1990). No plasma seminal bovino, as principais proteínas de ligação à heparina são as BSP (proteínas de ligação ao espermatozoide).

Avaliando a ligação das proteínas BSP, Manjunath *et al.* (1993) 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 da fertilização.

As proteínas BSP modulam a atividade da fosfolipase A2; com isso, regulam o metabolismo dos fosfolípidios da membrana espermática (MANJUNATH *et al.*, 1994). Os sítios de ligação dos colina-fosfolípidios na membrana espermática são substratos para a fosfolipase A2 (PLA2), uma enzima-chave na capacitação (SOUBEYRAND; LAZURE; MANJUNATH, 1998). Posteriormente, foi comprovado que as BSP promovem a capacitação espermática pela remoção do colesterol da membrana plasmática (THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH., 1998; MOREAU *et al.*, 1998;

THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH., 1999); quando isso ocorre, a taxa de colesterol/fosfolípidos diminui, acontece o influxo de cálcio, e o pH intracelular aumenta. Acredita-se que estes eventos sejam essenciais para que ocorra a reação acrossomal (MCCAULEY; BELLIN; AX, 1996; THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH., 1999). Estas proteínas também podem modular os efeitos de outros agentes capacitantes como a progesterona e a angiotensina-II (FIOL DE CUNEO *et al.*, 2004).

As principais proteínas que contribuem para concentração total de proteínas do plasma seminal equino, quando isoladas, foram designadas proteínas do plasma seminal equino (HSP-1 a 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 (CALVETE, *et al.*, 1994).

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. Estudos demonstraram que o padrão de interações das proteínas HSP-1/2 com a membrana plasmática do espermatozoide é similar ao das BSP-A1/A2 (PDC-109) (GREUBE *et al.*, 2004). Mesmo assim, estas proteínas homólogas de diferentes espécies podem exibir propriedades biológicas distintas (CALVETE *et al.*, 1997; GREUBE *et al.*, 2004).

HSP-1, HSP-2, HSP-3 e HSP-4 foram as proteínas detectadas em todas as frações do ejaculado equino, além de estarem presentes no plasma seminal de todos os garanhões estudados. As quantidades relativas destas proteínas foram correlacionadas positivamente com a concentração espermática (KARESKOSKI *et al.*, 2011).

Também foi verificada uma relação quantitativa negativa entre as proteínas HSP-1 (SP-1), HSP-2 (SP-2) e a fertilidade (NOVAK *et al.*, 2010). Na equação, a HSP-1 (SP-1), a clusterina e a citrato sintase da membrana plasmática foram preditivos da fertilidade em garanhões ( $r = 0.77$ ,  $P < 0.0001$ ). Entretanto, a contribuição das proteínas da membrana plasmática, no modelo foi de aproximadamente 10%, comparado aos 90% de contribuição das proteínas do plasma seminal e ainda, a abundância destas duas proteínas do PS explica a maioria (82%) das diferenças na fertilidade entre garanhões (NOVAK *et al.*, 2010).

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) e 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 de seu N-terminal nem sua funcionalidade são encontradas em proteínas de outras espécies (CALVETE *et al.*, 1994).

HSP-6 e HSP-8 são diferentes isoformas de uma mesma proteína, que pertence à família das calicreínas (CALVETE *et al.*, 1994). A sequência do N-terminal de ambas as isoformas mostrou alto grau de homologia com o antígeno prostático humano (PSA), que está envolvido na clivagem do coágulo seminal (JONSSON *et al.*, 2005).

### 2.2.2 Outras Proteínas do Plasma Seminal

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 no cão (KIKUCHI *et al.*, 2003) e assim como a leptina e os fatores de crescimento, que podem promover a longevidade do espermatozoide (LACKEY; GRAY; HENRICKS, 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). Através de espectrometria de massa foram identificadas 59 proteínas no plasma seminal de equinos entre elas: a calmodulina, glicoproteína zinco-alfa 2, angiotensina I, hexosaminidase B, glutathione peroxidase secretória epididimária, inibidor da metaloproteínas-2, catepsina B, BSP 5 (BSP 30 KDa), acrosina, glicose-6-fosfato isomerase, protosoma subunidade alfa tipo 2, tipo 3 e tipo 6, proteína de ligação ao cálcio (45 KDa), precursor da desoxiribonuclease gama. Também foi encontrado, no plasma seminal de garanhões, o Fator de crescimento nervo B (bNGF), previamente identificado como fator de ovulação (OIF) em alpacas e lhamas (DRUART *et al.*, 2013).

## 2.3 A Concentração de Proteína Total

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes na maioria dos processos biológicos. O desenvolvimento de metodologias para determinar proteínas

tem, cada vez mais, se tornado de fundamental relevância em várias áreas do conhecimento. Os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais são muito variados, no entanto as metodologias geralmente mais utilizadas são as do biureto, a de Lowry, a de Bradford e o da absorção de proteínas no ultravioleta (KING, 1988).

A principal vantagem do método de Lowry *et al.* (1951) é a sua alta sensibilidade e, por isto tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios sendo eles: líquido (HISCHE *et al.*, 1982), plasma sanguíneo (HUNN; GREER, 1990), saliva humana (JENZANO *et al.*, 1986), tecido animal (UPRETI; RATCLIFF; RICHES, 1988; HARRINGTON, 1990), membranas (WESSEL; FLÜGGE, 1984; RODRÍGUEZ-VICO *et al.*, 1989), leite humano (PATTON; HUSTON, 1984; KELLER; NEVILLE, 1986), produtos alimentícios (SEBECIC, 1987) e plasma seminal (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993; JOBIM *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 2012).

A quantificação de uma proteína em especial deve ser efetuada utilizando métodos mais específicos, como os métodos utilizados em cromatografia (MAGDALENO *et al.*, 1997; NAUC; MANJUNATH, 2000; KARESKOSKI *et al.*, 2011) ou através de radioimunoensaio (BERGERON *et al.*, 2007; NOVAK *et al.*, 2010).

## 2.4 A Cromatografia

A cromatografia é uma técnica relatada cientificamente há pouco mais de cem anos e baseia-se na migração de componentes de uma mistura entre duas fases: a fase estacionária que retém elementos e a fase móvel que conduz a mistura por meio de um soluto através da fase estacionária. É uma técnica que pode ser utilizada para purificação, detecção e quantificação de substâncias ou auxiliar na separação de substâncias indesejáveis. As técnicas cromatográficas podem ser divididas principalmente em cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e atualmente a cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC) (PERES, 2002).

A cromatografia em papel é uma técnica de partição líquido-líquido, estando um deles fixado a um suporte sólido. Baseia-se na diferença de solubilidade das substâncias

entre duas fases imiscíveis (DEGANI; CASE; VIERA, 1998; ETTRE, 2000). A cromatografia em papel é uma das técnicas mais simples e que requer menos instrumentos para sua realização, sendo muito útil para a separação de compostos polares (PERES, 2002). O papel é composto por moléculas de celulose que possuem afinidade pela água, mas muito pouca afinidade pela fase orgânica, atuando como suporte inerte contendo a fase estacionária aquosa (polar). À medida que o solvente contendo o soluto flui ao longo do papel, uma partição deste composto ocorre entre a fase móvel (pouco polar) e a fase estacionária. Com o fluxo contínuo de solvente, o efeito desta partição entre as fases móvel e estacionária possibilita a transferência do soluto do seu ponto de aplicação no papel para outro ponto localizado a alguma distância do local de aplicação no sentido do fluxo de solvente (PERES, 2002).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido, na qual a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária (DEGANI; CASE; VIERA, 1998). A CCD está embasada na separação de substâncias por meio das suas diferentes velocidades de migração em razão da afinidade relativa com solventes, fixando-se numa fase sólida (XAVIER *et al.*, 2007). A CCD é um método simples, rápido e econômico, sendo a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas (DEGANI; CASE; VIERA, 1998). Neste método a fase estacionária é uma camada fina formada por um sólido granulado (sílica, alumina e poliamida) depositado sobre uma placa que deve atuar como suporte inerte. Na CCD gotas da solução a ser separada são aplicadas em um ponto próximo ao extremo inferior da placa. Após a secagem da placa, ela é colocada em um recipiente contendo a fase móvel, de modo que somente sua base fique submersa. O solvente começa a molhar a fase estacionária e sobe por capilaridade. Após o deslocamento da fase móvel deixa-se a placa secar, e posteriormente é realizada a revelação da placa com reativos que deem cor as substâncias de interesse (PERES, 2002). O parâmetro de maior importância na CCD é o fator de retenção, que é a razão entre a distância percorrida pela substância e a distância percorrida pela fase móvel. Esse fator determinará se a substância analisada confere com a substância padrão (DEGANI; CASE; VIERA, 1998).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com alto poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Dependendo da substância a ser analisada e do tipo de detector empregado pode-se detectar cerca de 10-12g do composto por mL<sup>-1</sup>, o que permite que pequenas quantidades da amostra sejam

analisadas (PERES, 2002). Esta técnica está baseada na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida ou sólida, que propiciam a separação da mistura por meio de processos físicos e químicos (DEGANI; CASE; VIERA, 1998; PERES, 2002). A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou termicamente estável (PERES, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica responsável por grandes avanços na área cromatográfica. A HPLC utiliza suporte com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, sendo um método adequado para separação de espécies iônicas e macromoléculas (DEGANI; CASE; VIERA, 1998). Devido à utilização de colunas com grande capacidade de separação a realização da HPLC requer a utilização de equipamentos específicos, com o uso de bombas e colunas que suportem altas pressões necessárias para eluição da fase móvel. Assim a realização da HPLC necessita da utilização de um cromatógrafo composto de bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador (DEGANI; CASE; VIERA, 1998; PERES, 2002).

Na HPLC a fase móvel deve ser um solvente que dissolva a amostra sem que qualquer interação química ocorra entre ambas. A fase estacionária deve ser compatível com o detector, possuindo polaridade apropriada para permitir a separação adequada dos componentes da amostra. Já a coluna cromatográfica deve ser confeccionada de material inerte e que resista a altas pressões. Por fim os detectores devem apresentar ampla faixa de aplicação, sendo que os mais utilizados são os espectrais (PERES, 2002).

A evolução das colunas e da fase estacionária permitiu o uso de partículas muito pequenas, desenvolvendo assim a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC). A U-HPLC é um método cromatográfico com análises mais rápidas, consumo menor de solventes e com eficiência muito mais elevada que a HPLC. No entanto, apesar de todas as vantagens da UHPLC, o custo do equipamento e a manutenção requerida devido a utilização de condições extremas de pressão requer ainda maior desenvolvimento da técnica (MALDANER; JARDIM, 2009).

A cromatografia tem sido utilizada em diferentes áreas do conhecimento. A grande sensibilidade de técnicas cromatográficas possibilitou o seu uso de forma rotineira em análise de substâncias em baixa concentração, como no caso do doping, controle de alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, na toxicologia entre muitas outras aplicações (NAKASHIMA, 2005; ANVISA, 2012; CHINCHOLE *et al.*, 2012; GILBERT-LÓPEZ; GARCIA-REYES; MOLINA-DIAZ, 2012; XU *et al.*, 2012).

A química é a área na qual as técnicas cromatográficas são mais utilizadas, sendo muitos os trabalhos publicados que a empregam. Pode ser utilizada para dosar compostos em alimentos (GILBERT-LÓPEZ; GARCIA-REYES; MOLINA-DIAZ, 2012; XU *et al.*, 2012), no monitoramento de componentes tóxicos no meio ambiente (MARRIOTT; HAGLUND; ONG, 2003) ou mesmo na indústria petroquímica (MÜHLEN *et al.*, 2006).

Na área farmacêutica a cromatografia também tem vasto campo de utilização. Pode ser empregada para dosar princípios ativos de drogas em medicamentos (ANVISA, 2012), isolar componentes medicinais de plantas (LÜ *et al.*, 2012), auxiliar em estudos de farmacocinética (AMORIM *et al.*, 2008; GIORGI *et al.*, 2009), validar técnicas de identificação de agentes (AMORIM *et al.*, 2008), entre inúmeros outros usos.

Na medicina a cromatografia é utilizada para realização de exames antidoping (NAKASHIMA, 2005; CHINCHOLE *et al.*, 2012), monitorar níveis de drogas em pacientes que estejam em tratamento (VERDIER *et al.*, 2012), realizar diagnóstico de enfermidades (JELLUM, 1988; JEONG *et al.*, 2009), em estudos forenses e na toxicologia (NAKASHIMA, 2005; CHINCHOLE *et al.*, 2012).

Na veterinária a cromatografia tem a possibilidade de utilização em diversas áreas, como em estudos de farmacocinética (AMORIM *et al.*, 2008), para monitorar resíduos de drogas em produtos de origem animal (CARDOSO *et al.*, 1999; FELTRIN *et al.*, 2007; ANVISA, 2009), na toxicologia (KAISER *et al.*, 2010; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2012), na quantificação de proteínas (MAGDALENO *et al.*, 1997; NAUC; MANJUNATH, 2000; KARESKOSKI *et al.*, 2011), entre outras.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica responsável por grandes avanços na área cromatográfica. A HPLC utiliza suporte com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, sendo um método adequado para separação de espécies iônicas e macromoléculas (DEGANI; CASE; VIERA, 1998). Devido à utilização de colunas com grande capacidade de separação a realização da HPLC requer a utilização de equipamentos específicos, com o uso de bombas e colunas que suportem altas pressões necessárias para eluição da fase móvel. Assim a realização da HPLC necessita da utilização de um cromatógrafo composto de bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador (DEGANI; CASE; VIERA, 1998; PERES, 2002).

Na HPLC a fase móvel deve ser um solvente que dissolva a amostra sem que qualquer interação química ocorra entre ambas. A fase estacionária deve ser compatível



com o detector, possuindo polaridade apropriada para permitir a separação adequada dos componentes da amostra. Já a coluna cromatográfica deve ser confeccionada de material inerte e que resista a altas pressões. Por fim os detectores devem apresentar ampla faixa de aplicação, sendo que os mais utilizados são os espectrais (PERES, 2002).

## 2.5 A Fertilidade

A predição da fertilidade de um animal baseada nas suas características seminais vem sendo estudada extensivamente nos machos de diversas espécies, incluindo bovino (KASTELIC; THUNDATHIL, 2008), suíno (O'MEARA *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-PARTIDA *et al.*, 1999) e humano (AITKEN, 2006; LEWIS, 2007; SIGMAN; BAAZEEN; ZINI, 2009). Dentre as características avaliadas, estão incluídas motilidade total e progressiva (DOWSETT; PATTIE, 1982; JASKO *et al.*, 1992; KENNEY *et al.*, 1971), morfologia (KENNEY *et al.*, 1971; JASKO; LEIN; FOOTE, 1990) e qualidade do DNA (MORRELL *et al.*, 2008; LOVE; KENNEY, 1998).

A motilidade e morfologia espermática podem (KENNEY *et al.*, 1971; JASKO; LEIN; FOOTE, 1990) ou não (DOWSETT; PATTIE, 1982; VOSS; PICKETT; SQUIRES, 1981) explicar algumas diferenças observadas na fertilidade. A relação entre esses parâmetros e a fertilidade inerente ao garanhão ainda não está clara (MOCÉ; GRAHAM, 2008). A variação na relação entre qualidade espermática e fertilidade nesta espécie pode ser limitada pelo número de animais avaliados, bem como o número de éguas cobertas por cada garanhão (KENNEY *et al.*, 1971; VOSS; PICKETT; SQUIRES, 1981; CASEY *et al.*, 1997).

Além disso, metodologias utilizadas para determinar os critérios de qualidade do sêmen apresentam resultados variados, introduzindo fatores que podem alterar a interpretação dos achados. Neste sentido, torna-se de grande importância o estudo de Amann (2005), onde menciona que a conclusão da maioria dos estudos publicados sobre fertilidade, que relatam ausência de diferença significativa devido ao tratamento(s) são suspeitos, porque normalmente, o número animais utilizados foi insuficiente. Apesar da relação incerta entre qualidade espermática e fertilidade, recomendações são sempre relatadas na hora da seleção do garanhão. Embora a seleção para fertilidade seja um objetivo relevante, esta não deve ser baseada em dados

imprecisos, certos critérios da qualidade do sêmen são recomendados a fim de qualificar um garanhão para registro (COLENBRANDER *et al.*, 1992), aprovação (PICKETT; VOSS, 1972) ou categorização na avaliação reprodutiva (KENNEY *et al.*, 1983). No entanto, o nível de fertilidade alcançado por garanhões com sêmen de determinada qualidade não é confirmado.

A avaliação da fertilidade ou da "potencial fertilidade" de um garanhão é uma parte importante na seleção de reprodutores e no manejo reprodutivo. Além disso, o histórico reprodutivo progresso e qualidade do sêmen podem ser dados inestimáveis para a investigação de problemas reprodutivos ou sua suspeita. É claro que os verdadeiros índices de fertilidade são o diagnóstico de prenhez e as taxas de concepção, porém ambos são retrospectivos e são influenciados significativamente por fatores extrínsecos ao garanhão, como a qualidade da égua, o manejo reprodutivo (SULLIVAN *et al.*, 1975; VAN BUITEN; REMMEN; COLENBRANDER, 1998; MORRIS; ALLEN, 2002) e ainda pela variação na fertilidade das fêmeas cobertas por ele (AMANN, 2005).

Ainda, em muitas circunstâncias um teste prospectivo é desejado para que uma provável subfertilidade possa ser identificada antes do início da vida reprodutiva do garanhão. Dentro desse contexto de seleção de garanhões para uma avaliação reprodutiva, tornou-se aceitável que a combinação de um exame físico completo e avaliação convencional do sêmen oferece uma alternativa útil para dados reais de fertilidade (KENNEY *et al.*, 1983; BRITISH EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 1991). No entanto, mesmo que a baixa qualidade do sêmen seja um bom indicador de subfertilidade, um sêmen de alta qualidade (em termos de número de espermatozoides, motilidade e normalidade morfológica) não é garantia de fertilidade aceitável. Por esta razão, um esforço considerável está sendo realizado na identificação de marcadores capazes de prever com maior precisão a fertilidade de garanhões. Diversos testes desenvolvidos recentemente pretendem identificar anormalidades incompatíveis com a fertilidade, e uma combinação dos testes disponíveis deve identificar um maior número de garanhões subférteis, podendo eventualmente ser ajustada para proporcionar o verdadeiro potencial reprodutivo de um animal (GRAHAM, 2001).

Marcadores genéticos também podem ser utilizados como indicadores de fertilidade em garanhões, em programas de melhoramento genético, bem como na seleção desses animais e no manejo reprodutivo. Recentemente, um polimorfismo não-

sinônimo E208K (mutação que leva à troca de aminoácidos) no gene da CRISP3 foi detectado e associado à fertilidade em garanhões. Animais heterozigotos para este polimorfismo genético obtiveram taxas de prenhez por ciclo 7% mais baixas do que animais homozigotos para esta mutação. De acordo com Hamann *et al.* (2007), os genes que codificam a proteína CRISP3 são candidatos promissores a indicadores de fertilidade, pois estudos prévios demonstram que essa proteína possui papel importante na habilidade fertilizante de garanhões. Análises de associação sugerem que homozigosidades para alelos específicos do gene da CRISP3 possivelmente confirmam um maior potencial fértil em garanhões.

Outros genes candidatos para fertilidade são hormônios e seus receptores, pois eles modulam fases limitantes em várias reações do sistema reprodutivo. Muitos mecanismos reprodutivos estão sujeitos à regulação hormonal pelo eixo hipotálamo-pituitária e testículo (GIESECKE *et al.*, 2010a). Segundo Roser (2008) a concentração intratesticular do hormônio inibina pode ser um bom marcador para a detecção prévia de problemas reprodutivos em garanhões jovens. No intuito de medir concentrações intratesticulares de inibina em garanhões, faz-se necessário a coleta de material de origem testicular para biópsia. Por esta razão, Giesecke *et al.* (2010a) selecionaram o gene da inibina beta A (INHBA) para a avaliação da sua influência na fertilidade de garanhões Hanoverianos. Polimorfismos no gene INHBA podem ter influência no desenvolvimento das células de Sertoli e Leydig e possivelmente tenham efeito no número de células germinativas e na espermatogênese (DE KRETZER *et al.*, 2004; LOVELAND *et al.*, 2005; BILEZIKJIAN *et al.*, 2006; ITMAN *et al.*, 2006).

A proteína SPATA1 específica do testículo está envolvida na formação da cabeça do espermatozoide durante a espermatogênese. Segundo Giesecke *et al.* (2009), polimorfismos no gene que codifica essa proteína, conferem uma maior fertilidade a garanhões através de um componente embrionário, onde animais heterozigotos para esse tipo de mutação demonstraram taxas de prenhez por ciclo 4% mais altas em comparação a animais homozigotos. Acredita-se existirem outros polimorfismos em outros genes que influenciem a fertilidade de garanhões. Portanto, esta mutação no gene da SPATA1 explica em parte a variação entre taxas de prenhez por ciclo em garanhões. Esses resultados precisam de uma confirmação com um maior número de amostras e re-sequenciamento do gene SPATA1 em garanhões, o que pode contribuir significativamente para as diferenças entre taxas de prenhez por ciclo.

Desenvolvimentos recentes em genômica equina proporcionam possibilidades e ferramentas para o mapeamento de peculiaridades da fertilidade no cavalo, desvendando as causas de intersexualidade e defeitos reprodutivos congênitos. Até o presente momento, poucos estudos genéticos foram desenvolvidos sobre a fertilidade do garanhão. Estudos moleculares em genes candidatos a marcadores de fertilidade, como CRISP3, SPATA1 e INHBA são encorajadores e com as novas ferramentas disponíveis para associações genômicas amplas, o conhecimento de fatores genéticos relacionados à problemas na fertilidade de garanhões irá se ampliar (GIESECKE; SIEME; DISTL, 2010b).

É importante conhecermos e quantificarmos outras proteínas cujos genes possam ser candidatos à fertilidade do garanhão, e este estudo pode ser o início de muitas pesquisas nesta área.

### 3 ARTIGO

#### **HORSE SEMINAL PLASMA PROTEINS (HSP-1 AND HSP-2) CONCENTRATION: A POSSIBLE MARKER FOR POOR FERTILITY?**

Luisa. A. D. Garcia, Enio L. R. Brito, Priscila Serpa, Joana Gregory, Claudio Natalini,  
Rodrigo C. Mattos, Maria Inês M. Jobim\*

Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Faculdade de  
Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Artigo aceito para publicação na *Pferdeheilkunde* 30 (2014) 5 (September/Oktober)  
557-560

#### **ZUSAMMENFASSUNG**

Die Proteine des Seminalplasmas wurden im Zusammenhang mit dem Fruchtbarkeits- oder Unfruchtbarkeitslevel diverser Säugetiere, speziell der Haustiere, bewertet.

Die "Horse Seminal Plasma" Proteine 1 (HSP-1) und 2 (HSP-2) sind die am meisten vorkommenden Proteine im Seminalplasma von Pferden. Ziel der Studie war es, die Konzentration des Seminalplasmas HSP-1/2 und die gesamten Proteine bei erwachsenen Hengsten, während und außerhalb der Decksaison zu untersuchen und festzustellen, ob diese Konzentrationen mit der Fruchtbarkeit zusammenhängen. Seminalplasma wurden aus 42 Ejakulaten von 11 erwachsenen Hengsten (3-25 Jahre) gewonnen. Die Hengste wurden in zwei Gruppen aufgeteilt (hohe und niedrige Fruchtbarkeit) gemäß der Trächtigkeitsrate der Stuten und der Viabilität des Samens in der Samenentnahme des ersten Tages. Samenplasma wurde aus 42 Ejakulaten gewonnen und die Konzentration von HSP-1/2 (mg/mL) wurden mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Anwendungen einer UHPLC Trennsäule gemessen und analysiert. Es wurden signifikante Unterschiede ( $P < 0.05$ ) in der Konzentration der gesamten und der HSP-1/2 Proteine (mg/mL, Durchschnitt  $\pm$  SD) im Ejakulat der Hengste mit hohen und niedrigen Fruchtbarkeit festgestellt. Die HSP-1/2 Konzentration der Hengste mit hoher Fertilität zeigte keinen Unterschied im ersten

und zweiten Ejakulat sowohl während als auch außerhalb der Decksaison. Seminalplasma, der mit niedriger Fertilität eingestuft Hengste, zeigten einen signifikanten Unterschied ( $P < 0.05$ ) zwischen dem ersten und zweiten Ejakulat sowohl innerhalb als auch außerhalb der Decksaison. Abschließend wurde festgestellt, dass die HPS-1/2 Konzentration, die am häufigsten vorkommende Proteine, höher im Ejakulat der Hengste mit niedriger Fertilität war, diese nicht durch die Saison beeinflusst wurde und kann als Biomarker geringer Fertilität eingesetzt werden.

**Schlüsselwörter:** Hengst, UHPLC, Decksaison, Seminalplasma

### ABSTRACT

Seminal plasma (SP) proteins have been assessed in relation to reproductive fertility levels or infertility, in several species of mammals, particularly domestic animals. Horse seminal plasma proteins 1 (HSP-1) and 2 (HSP-2) are the most abundant proteins in equine seminal plasma. The aim of this study was to investigate in adult stallions the concentrations of seminal plasma HSP-1/2 and total protein in the breeding season and non-breeding season and to determine if these concentrations were related with fertility. SP was obtained from 42 ejaculates of 11 adult stallions (3-25 yrs). Stallions were allocated into two groups (good and poor fertility) according to pregnancy rates of mares, and to their semen viability data in the first collection day. Seminal plasma HSP-1/2 concentrations (mg/mL) were measured and analyzed by an Ultra High Performance Liquid Chromatography using a UHPLC column. There were significant differences ( $P < 0.05$ ) in total protein and HSP-1/2 concentration (mg/mL, mean  $\pm$  SD) in the ejaculates from good and poor fertility stallions. The HSP-1/2 concentration did not show differences in the first and second ejaculates of good fertility stallions in both the non-breeding and breeding season. SP of stallions classified as poor fertility showed significant difference ( $P < 0.05$ ) in HSP-1/2 concentration between the first and second ejaculate in both the non-breeding and breeding season. In conclusion, the concentration of the major proteins of stallion seminal plasma HSP-1/2 was higher in ejaculates from stallions with poor fertility, is not influenced by the season and could serve as biomarker for poor fertility in stallions.

**Key words:** stallion, UHPLC, breeding season, seminal plasma

## 1 Introduction

Progress has been made in developing reliable indicators of ejaculate quality that allow exclusion of low-quality ejaculates for use in natural breeding or artificial insemination. Physical semen characteristics and sperm morphology measurements allow detection of the stallions most likely to be fertile. However, some of them are or became subfertile despite acceptable results of the conventional breeding soundness examination (BARRIER-BATTUT *et al.*, 2005). The ability to select these fertile stallions or predict fertility using biomarkers is a promising goal. Accurate or predictive genetic and protein markers are still needed.

The suggested functions of seminal plasma proteins include their involvement in several essential steps preceding fertilization, such as regulating sperm capacitation, establishment of the oviductal sperm reservoir, modulation of the uterine immune response and sperm transport in the female genital tract, as well as in gamete interaction and fusion (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005).

Seminal plasma (SP) proteins have been assessed in relation to reproductive fertility levels or infertility, in several species of mammals, particularly domestic animals. SP proteins have been identified as associated with high and low fertility in bulls (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993) isolated as osteopontin (OPN) and lipocalin-type prostaglandin D synthase respectively (CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1997; GERENA *et al.*, 1998). The latter has been always present in the sperm-rich fraction of ejaculates in species with fractionated ejaculation. OPN has been related to fertility in pigs (HAO *et al.*, 2006; HAO *et al.*, 2008) and stallions (BRANDON *et al.*, 1999). Jobim *et al.* (2005) observed one protein (20–25 kDa, pI 8.5–8.7) present only in the ejaculates of high fertility stallions and another protein (25–30 kDa, pI 7.5–7.7) that had higher relative protein content in ejaculates of low fertility stallions. More recently, the abundance of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP3) was positively related to first cycle conception rate and the abundance of four seminal plasma proteins were identified as being negatively related to fertility; these were identified as kallikrein-1E2 (KLK2), clusterin, and seminal plasma proteins 1 (SP1) and 2 (SP2) (NOVAK *et al.*, 2010).

Horse seminal plasma proteins 1 (HSP-1) and 2 (HSP-2); recently, renamed SP-1 and SP-2, respectively are the most abundant proteins in equine seminal plasma, accounting for 70–80% of the total proteins (CALVETE *et al.*, 1994). They showed

heparin-binding ability (CALVETE *et al.*, 1994) and were found to be associated to the sperm surface, indicating a potential role in fertilization (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005). They belong to the short seminal Fn-2 type proteins (CALVETE *et al.*, 1995b; EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005) and are the equine orthologs to the major bovine heparin-binding proteins (BSP), which have been shown to be involved in early fertilization steps (capacitation).

The season of the year influences many of the physical and chemical characteristics of stallion semen as well as fertility (PICKETT; FAULKNER; VOSS, 1975). The influence of season on the total protein concentration and the composition of seminal plasma of many species has been described in the ram (PEREZ-PÉ *et al.*, 2001; CARDOZO *et al.*, 2006), boar (TRUDEAU; SANFORD, 1986; STRZEZEK, 2002) and horse (JANETT *et al.*, 2003), with significant differences between breeding and non-breeding seasons.

The aim of this study was to investigate in adult stallions the concentrations of seminal plasma HSP-1/2 and total protein in the breeding season and non-breeding season and to determine if these concentrations were related with fertility.

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Animals and Sample Collection**

Seminal plasma was obtained from 11 adult stallions (3-25yrs) from commercial herds in the State of Rio Grande do Sul, Brazil (30° 16' 57" latitude south and 55° 53' 47" longitude west at 145 meters above sea level). Data were collected during the non-breeding season (winter and spring months) and the breeding season (summer months). Stallions were maintained under similar handling and feeding conditions, kept free in pastures. They were allocated into two groups (good and poor fertility; GIESECKE *et al.*, 2010a) according to pregnancy rates of mares assessed by veterinary and to their semen viability data in the first collection day. Stallions of good fertility (n = 6) had a minimum of 65% of pregnancy rates during the 2-year period and more than  $1.5 \times 10^9$  viable sperm. Stallions classified as poor fertility (n = 5) had no more than 55% of pregnancy rates and less than  $1.4 \times 10^9$  viable sperm. Sperm viability (SV) was



calculated using the following formula:  $SV = \text{progressive sperm motility} * \text{morphologically normal sperm} * \text{sperm concentration}$ .

Two ejaculates were collected by artificial vagina from each stallion in the breeding season and non-breeding season with one hour of interval. One of the poor fertility stallion died during the experiment and was not collected in the breeding season. A total of 42 ejaculates from 11 stallions were used. After collection and analysis, a 2.0 mL aliquot of semen was centrifuged at 1,500 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. Frozen samples were thawed, recentrifuged at 10,000 X g for 60 min at 4°C and 50 µL were taken from the supernatant and transferred to cryovials for storage at -80°C.

## **2.2 Semen Collection and Evaluation**

After collection, gel-free semen was taken to evaluate for volume, sperm motility, sperm concentration, and percent of morphologically normal sperm, according to conventional semen analysis described by Sieme *et al.* (2001).

## **2.3 Total Protein Concentration**

Protein concentration in seminal plasma from each sample was assessed according to the method described by Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin (1 mg/mL) as a standard.

## **2.4 HSP-1/2 Concentration**

Seminal plasma HSP-1/2 concentrations (mg/mL) were measured according to the method described by Calvete *et al.* (1997) with modification (trifluoroacetic acid was replaced by trichloroacetic acid as one of the mobile phases for chromatography analyses). The samples were defrosted at room temperature, filtered in 0.22 µm filters (Biofil Syringe Filter) and analyzed by an Ultra High Performance Liquid

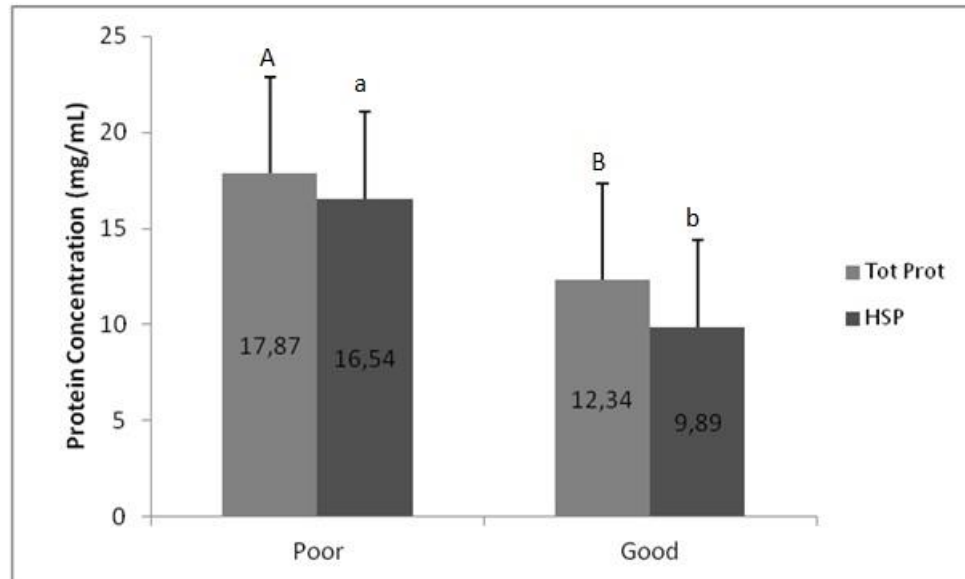
Chromatography (5  $\mu$ L of sample were injected) using a Thermo Fisher Scientific UHPLC column (Hypersil Gold AX 50 x 2.1mm, 1.9 micron pore) eluted at 1 mL/min with a gradient of 0.1% (v/v) trichloroacetic acid in (A) water and (B) acetonitrile as follows: isocratically with 25% B for 5 min, followed by 25–30% B for 5 min, and 30–70% B for 160 min. Proteins were detected at 220 nm. Integration of the sample curves with the calibration curve was done with ChromQuest<sup>®</sup> and values for the HSP-1/2 protein concentration were attained. The calibration curve was obtained with HSP-1/2 purified kindly provided by Dr. J. J. Calvete (Instituto de Biomedicina de Valencia, Spain).

## 2.5 Statistical Analysis

Data were analyzed using a Statistical Analysis Software (SAS<sup>®</sup>). Analysis of variance (GLM – General Linear Model) was performed to compare (among fertility groups) the HSP-1/2 and total protein concentrations in the first and second ejaculate from good and poor fertility stallions measured in the non-breeding and breeding season. Tukey post hoc test was used to locate differences and  $P < 0.05$  was regarded as significant.

## 3 Results

Overall pregnancy rates ranged from 66–100% in stallions of good fertility and from 0–53% in stallions of poor fertility. In two samples from the good fertility group and in one sample from the poor fertility group, HSP-1/2 detection was not possible. HSP-1/2 (n = 39 ejaculates) and total protein concentration (n = 42 ejaculates) (mean  $\pm$  SD) from stallions with good and poor fertility are shown in Figure 1.



**Figure 1.** HSP-1/2 (n = 39 ejaculates) and total protein (n = 42 ejaculates) concentration (mean  $\pm$  SD) from stallion with good and poor fertility. Different superscripts indicate differences ( $P < 0.05$ ).

There were differences ( $P < 0.05$ ) in total protein and HSP-1/2 concentrations (mg/mL, mean  $\pm$  SD) in the ejaculates from good and poor fertility stallions. HSP-1/2 accounting for 80% of the total proteins in the samples of stallions of good fertility, while HSP-1/2 accounting for 93% of the total proteins in stallions classified as poor fertility. Results of HSP-1/2 concentration (mg/mL, mean  $\pm$  SD) in the first and second ejaculate from good and poor fertility stallions measured in the non-breeding and breeding season are shown in Table 1. There were no differences ( $P > 0.05$ ) in HSP-1/2 concentration among adult stallion ages (3-25yrs).

**Table 1.** HSP-1/2 concentration (mg/mL, mean  $\pm$  SE) in the first and second ejaculate from stallions with good (n = 6) and poor (n = 5) fertility measured in the non-breeding and breeding season.

Fertility	NON-BREEDING		BREEDING	
	Ejaculates			
	1	2	1	2
Good	10.97 $\pm$ 1.19 <sup>Aa</sup>	8.31 $\pm$ 0.82 <sup>Aa</sup>	10.98 $\pm$ 1.81 <sup>Aa</sup>	9.40 $\pm$ 2.04 <sup>Aa</sup>
	n = 6	n = 6	n = 5	n = 5
Poor	19.99 $\pm$ 1.21 <sup>Ba</sup>	13.51 $\pm$ 0.79 <sup>Bb</sup>	23.99 $\pm$ 1.80 <sup>Ba</sup>	13.77 $\pm$ 1.33 <sup>Ab</sup>
	n = 5	n = 4	n = 4	n = 4

<sup>A,B</sup> Column values with different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,b</sup> Row values with different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

#### 4 Discussion

As a part of the fertilization process, seminal plasma proteins play an important role in sperm reservoir formation, sperm capacitation and sperm-oocyte interactions (FOXCROFT *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2008). Specific seminal plasma proteins have previously been identified as potential markers of male fertility in the bull (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993) and stallion (BRANDON *et al.*, 1999; NOVAK *et al.*, 2010). The present study investigated seminal plasma HSP-1/2 concentration to determine if these concentrations are related with stallion fertility *in vivo*, providing the basis to use them as a complementary tool to identify sires with high and low relative fertility that could have a considerable impact on reproductive efficiency.

The highest values of HSP-1/2 concentration were found in the ejaculates from stallions with poor fertility in the non-breeding and breeding season. This is consistent with previous findings of Novak *et al.* (2010) in the breeding season. HSP-1/2 share significant homology with PDC-109 (CALVETE *et al.*, 1995b) and this protein at higher concentrations induces membrane permeabilization (GASSET *et al.*, 1997), stimulates cholesterol and phosphatidylcholine efflux (THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH, 1999), and also acts in the perturbation of the membrane integrity (CALVETE; SANZ, 2007). Perhaps the greater amount of HSP-1/2 in seminal plasma,

as detected in samples from stallions with poor fertility, had the same negative effect as PDC-109 above mentioned. HSP-1/2 exhibits chaperone-like activity and may protect other proteins of equine seminal plasma against misfolding, unfolding or aggregation (SANKHALA *et al.*, 2012). The structure of HSP-1/2 is largely unordered and it is likely that this structural plasticity helps it to interact with other seminal plasma proteins effectively and protect them under stress conditions. Probably the values observed in the poor fertility stallions were related with a stress condition with production of other proteins that stimulate the high concentration of HSP-1/2.

Additionally, the proteins HSP-1/2 were hypothesized to be similar to a sperm motility inhibitor protein (SPMI, 18-22 kDa) originating from the seminal vesicles (BRANDON *et al.*, 1999). The HSP-1/2 comprised 80% of the total proteins in the samples of stallions of good fertility which agree with the results of Calvete *et al.* (1994) that observed two major proteins, the heparin-binding HSP-1 and HSP-2, accounted for 70–80% of the total seminal plasma protein. However, an increase in HSP-1/2 concentration was observed in samples of seminal plasma of stallions classified as poor fertility. The findings of Calvete *et al.* (1994) come only from healthy reproductively active stallions while in this study were used stallions of good and poor fertility. Total protein concentration showed the same pattern found for HSP-1/2 concentration since these proteins together account for 70–80% of the total proteins in stallion seminal plasma (CALVETE *et al.*, 1994).

The HSP-1/2 show higher concentration in the ejaculates from stallions in the poor fertility group, in the first and second ejaculate in the non-breeding season and in the first ejaculate in the breeding season in comparison with the good fertility group. In contrast, the second ejaculate in breeding season not shown to vary between the fertility groups. Perhaps the increase in the ejaculations number of the stallions during the breeding season may have an effect in the amount of HSP-1/2 without variation between fertility groups in the second ejaculate.

The HSP-1/2 concentration did not show differences in the first and second ejaculates of good fertility stallions in both the non-breeding and breeding season, indicating uniformity in their concentrations. On the other hand, HSP-1/2 concentration observed in samples of seminal plasma of stallions classified as poor fertility showed difference between the first and second ejaculate in both the non-breeding and breeding season.

In conclusion, the concentration of the major proteins of stallion seminal plasma HSP-1/2 was higher in ejaculates from stallions with poor fertility, is not influenced by the season and could serve as biomarker for poor fertility in stallions.

#### **4 CONCLUSÃO**

Existem diferenças nas concentrações das principais proteínas do plasma seminal HSP-1/2 dos garanhões de alta e baixa fertilidade.

A concentração das HSP-1/2 foi superior nos ejaculados de garanhões de baixa fertilidade, e não foi influenciada pelo período de coleta (estação e fora da estação reprodutiva), podendo assim, ser indicada como biomarcador da baixa fertilidade em garanhões.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

É importante conhecermos e quantificarmos proteínas cujos genes possam ser candidatos à fertilidade do garanhão, e os resultados obtidos neste estudo poderão direcionar futuras pesquisas para a identificação precoce de reprodutores de alta e baixa fertilidade.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal: PAMVET: relatório 2006/2007: monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo.** Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 76 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d7ab358047458ad19443d43fbc4c6735/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 26 ago. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 11, de 23 de janeiro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 jan. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/042a338049f229df96d7bfaa19e2217c/Consulta+P%C3%BAblica+n%C2%B0+11+GGMED.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 26 ago. 2012.

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, Lawrence, v. 29, p. 69-75, 2006.

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**, Berlin, v. 53, n. 9, p. 481-485, 2006.

AMANN, R. P. Weaknesses in report of "fertility" for horses and other species. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 3, p. 698-715, 2005.

AMORIM, R.; GALHARDO, A.; VALADÃO, C. A. A.; PECCININI, R. G. Determinação de cetamina em plasma por HPLC: aplicação em um estudo de farmacocinética de associação medicamentosa em cães. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 29, n. 1, p. 69-75, 2008.

ASADPOUR, R.; ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI REZAI, S.; ANSARI, M. H. K. SDS364 polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 102, n. 3-4, p. 308-313, 2007.

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**, Stoneham, v. 59, n. 3-4, p. 901-914, 2003.

BARRIER-BATTUT, I.; DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; ROUVIERE, P.; STANCIU, C.; DACHEUX, F.; VIDAMENT, M. Seminal plasma proteins and semen characteristics in relation with fertility in the stallion. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1-4, p. 255-258, 2005.

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

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**, Champaign, v. 72, n. 9, 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**, Champaign, v. 74, n. 1, p. 173-182, 1996.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P.; Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 71, n. 4, p. 461-470, 2005.

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**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 120-126, 2007.

BILEZIKJIAN, L. M.; BLOUNT, A. L.; DONALDSON, C. J.; VALE, W. W. Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: activins and inhibins. **Reproduction**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 207-215, 2006.

BOISVERT, M.; BERGERON, A.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 656-661, 2004.

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

BRITISH EQUINE VETERINARY ASSOCIATION. Codes of practice for 1. veterinary surgeons and 2. breed societies in the United Kingdom and Ireland using artificial insemination for breeding equids. Newmarket, Suffolk: R & W Publications, 1991. 24p.

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 and Molecular Biology**, Noisy le Grand, v. 49, n. 3, p. 407-412, 2003.

CALVETE, J. J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 29, p. 411-426, 1994.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; RAID, 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 ligandbinding capabilities of the subunits. **Federation of European Biochemical**

**Societies Letters**, Amsterdam, v. 365, n. 2-3, p. 179-182, 1995a.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; 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. **The Biochemical Journal**, London, 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**, Amsterdam, v. 407, n. 2, p. 201-206, 1997.

CALVETE, J. J.; SANZ, L. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. **Society of Reproduction and Fertility – Supplement**, Nottingham, v. 65, p. 201-215, 2007.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, n. 6, p. 1293-1301, 1997.

CARDOSO, O. M. C.; SILVA, T. J. P.; SANTOS, W. L. M.; PESQUERO, J. L. Ocorrência de resíduos de dietilestilbestrol e zeranól em fígado de bovinos abatidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 305-310, 1999.

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

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**, Stoneham, v. 58, n. 8, 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**, Stoneham, v. 72, n. 7, p. 930-948, 2009.

CASEY, P. J.; GRAVANCE, C. G.; DAVIS, R. O.; CHABOT, D. D.; LIU, I. K. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, n. 2, p. 575-582, 1997.

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

CHINCHOLE, R.; HATRE, P. M.; DESAI, U.; CHAVAN, R. Recent applications of hyphenated liquid chromatography techniques in forensic toxicology: a review.

**International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Bangalore, v. 14, n. 1, 2012.

COLENBRANDER, B.; PUYK, H.; ZANDEE, A. R.; PARLEVLIIET, J. Evaluation of the stallion for breeding. **Acta Veterinaria Scandinavica – Supplement**, Kobenhavn, v. 88, p. 29-37, 1992.

CUASNICÚ, 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**, Mexico, v. 32, n. 6, p. 614-618, 2001.

DA ROS, V. G.; MUNUCE, M. J.; COHEN, D. J.; MARIN-BRIGGILER, C. I.; BUSSO, D.; VISCONTI, P. E.; CUASNICÚ, 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**, Champaign, v. 70, n. 5, p. 1325-1332, 2004.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 7, p. 21-25, 1998.

DE KRETZER, D. M.; BUZZARD, J. J.; OKUMA, Y.; O'CONNOR, A. E.; HAYASHI, T.; LIN, S. Y.; MORRISON, J. R.; LOVELAND, K. L.; HEDGER, M. P. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Greenwich, v. 225, n. 1-2, p. 57-64, 2004.

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

DIAS, A. J.; MAIA, M. S.; RETAMAL, C. A.; LOPEZ, M. L. Identification and partial characterization of alpha-1,4-glucosidase activity in equine epididymal fluid. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 7-8, p. 1545-1558, 2004.

DOWSETT, K. F.; PATTIE, W. A. Characteristics and fertility of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility – Supplement**, Oxford, v. 32, p. 1-8, 1982.

DRUART, X.; RICKARD, J. P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P. L.; KERSHAW-YOUNG, C. M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; CROSSET, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C. G.; DE GRAAF, S. P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 91, p. 13-22, 2013.

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**, New York, v. 61, n. 1, p. 32-41, 2002.

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**, New York, v. 70, n. 1, p. 45-57, 2005.

ELLERMAN, D. A.; DA ROS, V. G.; COHEN, D. J.; BUSSO, D.; MORGENFELD, M. M.; CUASNICÚ, P. S. Expression and structure-function analysis of DE, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 4, p. 1225-1231, 2002.

ETTRE, L. S. Chromatography: the separation technique of the 20th century. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 51, n. 1/2, p. 7-17, 2000.

FELTRIN, C. W.; MELLO, A. M. S.; SANTOS, J. G. R.; MARQUES, M. V.; SEIBEL, N. M.; FONTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 80-82, 2007.

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**, Stoneham, v. 62, n. 1-2, p. 207-216, 2004.

FOXCROFT, G. R.; DYCK, M. K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W. T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 8, p. 1324-1336, 2008.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, 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**, Tokyo, v. 51, n. 1, p. 37-46, 2005.

GASSET, M.; SAIZ, J. L.; LAYNEZ, J.; SANZ, L.; GENTZEL, M.; TÖPPER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 250, n. 3, p. 735-744, 1997.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, n. 3, p. 826-833, 1998.

GIESECKE, K.; HAMANN, H.; STOCK, K. F.; WOHLKE, A.; SIEME, H.; DISTL, O. Evaluation of SPATA1-associated markers for stallion fertility. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 359-365, 2009.

GIESECKE, K.; HAMANN, H.; SIEME, H.; DISTL, O. INHBA-associated markers as candidates for stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, n. 2, p. 342-347, 2010a.

GIESECKE, K.; SIEME, H.; DISTL, O. Infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: a review. **The Veterinary Journal**, London, v. 185, n. 3, p. 265-271, 2010b.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCIA-REYES, J. F.; MOLINA-DIAZ, A. Determination of fungicide residues in baby food by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 135, n. 2, p. 780-786, 2012.

GIORGI, M.; SACCOMANI, G.; LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.; KOWALSKI, C. Pharmacokinetic evaluation of tramadol and its major metabolites after single oral sustained tablet administration in the dog: a pilot study. **The Veterinary Journal**, London, v. 180, n. 2, p. 253-255, 2009.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 3-4, p. 239-247, 2001.

GREUBE, A.; MULLER, K.; TÖPFER-PETERSEN, E.; HERRMANN, A.; MÜLLER, P. Interaction of fibronectin type II proteins with membranes: the stallion seminal plasma protein SP-1/2. **Biochemistry**, New York, v. 43, n. 2, p. 464-472, 2004.

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**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 259-264, 2007.

HAO, Y.; MATHIALAGAN, N.; WALTERS, E.; MAO, J.; LAI, L.; BECKER, D.; LI, W.; CRITSER, J.; PRATHER, R. S. Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 75, n. 5, p. 726-733, 2006.

HAO, Y.; MURPHY, C. N.; SPATE, L.; WAX, D.; ZHONG, Z.; SAMUEL, M.; MATHIALAGAN, N.; SCHATTEN, H.; PRATHER, R. S. Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 75, n. 2, p. 291-298, 2008.

HARRINGTON, C. R. Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulfate in sulfate in microtiter plates for protein determinations on fractions from brain tissue. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 186, n. 2, p. 285-287, 1990.

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**, Amsterdam, v. 93, n. 1-2, p. 124-133, 2006.

HISCHE, E. A.; VAN DER HELM, H. J.; VAN MEEGAN, M. T.; BLANKEN, H. I. Protein estimation in cerebrospinal fluid with Coomassie brilliant blue. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 28, n. 5, p. 1236-1237, 1982.

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

HUNN, J. B.; GREER, I. E. Colorimetric and refractometer estimates of total plasma protein in striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). **Journal of Fish Biology**, London, v. 36, n. 4, p. 617-618, 1990.

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **Journal of Veterinary and Medical Science**, Tokyo, v. 64, n. 1, p. 75-77, 2002.

ITMAN, C.; MENDIS, S.; BARAKAT, B.; LOVELAND, K. L. All in the family: TGF-beta family action in testis development. **Reproduction**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 233-246, 2006.

JANETT, F.; THUN, R.; NIEDERER, K.; BURGER, D.; HÄSSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood Stallion. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, n. 3, p. 453-461, 2003.

JASKO, D. J.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 197, n. 3, p. 389-394, 1990.

JASKO, D. J.; LITTLE, T. V.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 200, n. 7, p. 979-985, 1992.

JELLUM, E. Chromatography for diagnosis of metabolic diseases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 452, p. 435-441, 1988.

JENZANO, J. W.; HOGAN, S. L.; NOYES, C. M.; FEATHERSTONE, G. L.; LUNDBLAD, R. L. Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 159, n. 2, p. 370-376, 1986.

JEONG, J. S.; SIM, H. J.; LEE, Y. M.; YOON, H. R.; LEE, D. H.; HONG, S. P. Determination of phenylalanine in blood by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection to diagnose phenylketonuria. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 30, p. 5709-5714, 2009.

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) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Curso de Medicina Veterinária, Santa Maria, 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 proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 2-3, p. 255-266, 2004.

JOBIM, M. I. M.; BUSTAMANTE FILHO, I. C.; TREIN, C. R.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Equine seminal plasma proteins related with fertility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1-4, p. 305-308, 2005.

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

KAISER, A. M.; MCFARLAND, W.; SIEMION, R. S.; RAISBECK, M. F. Secondary pentobarbital poisoning in two dogs: a cautionary tale. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 22, n. 4, p. 632-634, 2010.

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

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

KARESKOSKI, A. M.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; GUVENC, K.; REILAS, T.; CALVETE, J. J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Protein composition of seminal plasma in fractionated stallion ejaculates. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 1, p. 79-84, 2011.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 368-373, 2008.

KELLER, R. P.; NEVILLE, M. C. Determination of total protein in human milk: comparison of methods. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 32, n. 1, p. 120-123, 1986.

KENNEY, R. M.; KINGSTON, R. S.; RAJAMANNON, A. H.; RAMBERG, C. F. Stallion semen characteristics for predicting fertility. In: 17th ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 1971, **Proceedings**, Chicago, p. 53-67.

KENNEY, R. M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. Theriogenology and the Equine: part II: the stallion: semen examination. **Journal of the Society for Theriogenology**, Montgomery, v. 9, 1983, p. 1100.

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. **Journal of Veterinary and Medical Science**, Tokyo, 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**, Champaign, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.

KING, B. M. Glucocorticoids and hypothalamic obesity. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 29-37, 1988.

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

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**, Praha, v. 51, n. 3, p. 309-311, 2002.

LEE, S. T.; COOK, D.; RIET-CORREA, F.; PFISTER, J. A.; ANDERSON, W. R.; LIMA, F. G.; GARDNER, D. R. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. **Toxicon**, Elmsford, v. 60, n. 5, p. 791-796, 2012.

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**, Orlando, v. 106, n. 4, p. 1092-1098, 1982.

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

LEWIS, S. E. M. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? **Reproduction**, Cambridge, v. 134, n. 1, p. 31-40, 2007.

LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, n. 6, p. 955-972, 1998.

LOVELAND, K. L.; HOGARTH, C.; MENDIS, S.; EFTHYMIADIS, A.; LY, J.; ITMAN, C.; MEACHEM, S.; BROWN, C. W.; JANS, D. A. Drivers of germ cell maturation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1061, p. 173-182, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 193-265, 1951.

LÜ, H. T.; LIU, J.; DENG, R.; SONG, J. Y. Preparative Isolation and Purification of Indigo and Indirubin from *Folium isatidis* by High-speed Counter-current Chromatography. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 23, n. 6, p. 637-641, 2012.

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**, Nagoya, v. 41, n. 6, p. 715-722, 1999.

MAGDALENO, L.; GASSET, M.; VAREA, J.; SCHAMBONY, A. M.; URBANKE, C.; RAIDA, M.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CAVETE, J. J. Biochemical and conformational characterization of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 420, n. 2-3, p. 179-185, 1997.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **The Biochemical Journal**, London, v. 241, n. 3, p. 685-692, 1987.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major Proteins of Bovine Seminal Vesicles Bind to Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, 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**, Champaign, v. 50, n. 1, p. 27-37, 1994.

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

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

MARRIOTT, P. J.; HAGLUND, P.; ONG, R. C. Y. A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 328, n. 1-2, p. 1-19, 2003.

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**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 336-341, 1996.

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**, New York, v. 66, n. 4, p. 349-357, 2003.

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**, Champaign, v. 42, n. 5-6, p. 899-915, 1990.

- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, p. 104-118, 2008.
- 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**, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006.
- 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**, Orlando, v. 246, n. 1, p. 148-154, 1998.
- MORREL, J. M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A. M.; HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 50, n. 2, p. 1-7, 2008.
- MORRIS, L. H. A.; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 34, n. 1, p. 51-60, 2002.
- MÜHLEN, C. V.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC). **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 765-775, 2006.
- 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**, New York, v. 27, n. 1, p. 33-41, 1998.
- MUNGAN, N. A.; MUNGAN, G.; BASAR, M. M.; BAYKAM, M.; ATAN, A. Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm mobility. **Archives of Andrology**, New York, v. 47, n. 2, p. 113-117, 2001.
- NAKASHIMA, K. High-performance liquid chromatographic analysis of drugs of abuse in biologic samples. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 51, n. 3, p. 272-277, 2005.
- 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**, New York, v. 25, n. 3, p. 237-246, 1990.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 4, p. 1058-1066, 2000.
- 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**, Stoneham, v. 74, n. 6, p. 956-967, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, J. C.; CARMO, P. M. S.; PIEREZAN, F.; TOCHETTO, C.; LUCENA, R. B.; RISSI, D. R.; BARROS, C. S. L. Intoxicação por organofosforados em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 10, p. 803-806, 2010.

O'MEARA, C. M.; HANRAHAN, J. P.; PRATHALINGAM, N. S.; OWEN, J. S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARD, F.; WADE, M.; EVANS, A. C.; LONERGAN, P. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, n. 4, p. 513-522, 2008.

PATTON, S.; HUSTON, G. E. A method for isolation of human milk fat globules. **Nutrition Reports International**, Los Altos, v. 30, p. 1401, 1984.

PEÑA, F. J.; SARAVIA, F.; NUÑEZ-MARTINEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 93, n. 1-2, p. 101-113, 2006.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PÉREZ-PÉ, R.; BARRIOS, B.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seasonal differences in ram seasonal plasma revealed by partition in an aqueous twophase system. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 760, n. 1, p. 113-121, 2001.

PICKETT, B. W.; VOSS, J. L. Reproductive management of the stallion. **American Association of Equine Practitioners**, Golden, p. 501-531, 1972.

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; VOSS, J. L. Effect of season on some characteristics stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, n. 23, p. 25-28, 1975.

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**, Maracaibo, 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**, Stuttgart, 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**, Berlin, v. 242, n. 3, 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**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 179-186, 1997.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; ROCA, J.; PEÑA, F. J. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 8, p. 1242-1250, 2008.

RODRÍGUEZ-VICO, F.; MARTÍNEZ-CAYUELA, M.; GARCÍA-PEREGRÍN, E.; RAMÍREZ, H. A procedure for eliminating interferences in the Lowry method of protein determination. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 183, n. 2, p. 275-278, 1989.

ROMERO, A.; ROMÃO, M. J.; VARELA, P. F.; KOLLN, I.; DIAS, J. M.; CARVALHO, A. L.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structural and Molecular Biology**, New York, v. 4, n. 10, p. 783-788, 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**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 323, 2000.

ROSER, J. F. Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 3-4, p. 179-196, 2008.

SAALMANN, A.; MUNZ, S.; ELLERBROCK, K.; IVELL, R.; KIRCHHOFF, C. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 58, n. 1, p. 88-100, 2001.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L. G.; WINDSOR, D. P.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B. P.; MAXWELL, W. M. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 20, n. 2, p. 280-288, 1999.

SANKHALA, R. S.; KUMAR, C. S.; SINGH, B. P.; ARANGASAMY, A.; SWAMY, M. J. HSP-1/2, a major protein of equine seminal plasma, exhibits chaperone-like activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 427, n. 1, p. 18-23, 2012.

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**, Amsterdam, v. 300, n. 3, 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 and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1387, n. 1-2, p. 206-216, 1998.

SEBECIC, B. A new possibility of wheat protein content determination. **Nahrung**, Berlin, v. 31, n. 8, p. 817-823, 1987.

SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E.; BADER, H.; PETZOLDT, R.; MERKT, H. A.I.-sperm of the stallion: evaluation criteria and minimal standards – a survey. **Pferdeheilkunde**, v. 17, n. 2, p. 145-154, 2001.

SIEME, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 4, p. 769-784, 2004.

SIGMAN, M.; BAAZEEM, A.; ZINI, A. Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? **Seminars Reproductive Medicine**, New York, v. 27, n. 2, p. 115-123, 2009.

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

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, S. K.; GHOSH, S. K.; SINGH, L. P.; PRASAD, J. K.; KUMAR, A.; PERUMAL, P.; JEROME, A.; THAMIZHARASAN, A. Sequestration of PDC-109 protein improves freezability of crossbred bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 131, n. 1-2, p. 54-62, 2012.

STRZEZEK, J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 2, n. 3, p. 243-266, 2002.

SULLIVAN, J. J.; TURNER, P. C.; SELF, L. C.; GUTTERIDGE, H. B.; BARTLETT, D. E. Survey of reproductive efficiency in the quarter-horse and thoroughbred. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, Oxford, v. 23, p. 315-318, 1975.

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**, Berlin, v. 267, n. 20, p. 6175-6179, 2000.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 59, n. 4, p. 768-776, 1998.

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

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

TRUDEAU, V.; SANFORD, L. M. Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace boar. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, n. 4, p. 1211-1219, 1986.

UPRETI, G. C.; RATCLIFF, R. A.; RICHES, P. C. Protein estimation in tissues containing high levels of lipid: modifications to Lowry's method of protein determination. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 168, n. 2, p. 421-427, 1988.

VAN BUITEN, A.; REMMEN, J. L. A. M.; COLENBRANDER, B. Fertility of Shetland pony stallions used in different breeding systems: a retrospective study. **The Veterinary Quarterly**, Abingdon, v. 20, n. 3, p. 100-103, 1998.

VERDIER, M. C.; TRIBUT, O.; TATTEVIN, P.; TULZO, Y. L.; MICHELET, C.; FERRER, D. B. Simultaneous Determination of 12  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection: Application to Therapeutic Drug Monitoring. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 55, n. 10, p. 4873-4879, 2012.

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

VOSS, J. L.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L. Stallion spermatozoa morphology and motility and their relationship to fertility. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 178, p. 287-289, 1981.

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**, Orlando, v. 183, n. 1, p. 232-237, 1992.

WESSEL, D.; FLÜGGE, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 138, n. 1, p. 141-143, 1984.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; FLÓRIO, J. C.; SPINOSA, H. S. Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb (—chumbinho II) em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1231-1235, 2007.

XU, X. M.; YU, S.; LI, R.; FAN, J.; CHEN, S. H.; SHEN, H. T.; HAN, J. L.; HUANG, B. F.; REN, Y. P. Distribution and migration study of pesticides between peel and pulp in grape by online gel permeation chromatography-gas chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 135, p. 161-169, 2012.

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**, Stoneham, v. 54, n. 9, p. 1443-1452, 2000.



## APÊNDICE A

Horse Seminal Plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration

L. A. D. Garcia et al.

Pferdeheilkunde 30 (2014) 5 (September/Oktober) 557-560

# Horse Seminal Plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility?

Luisa. A. D. Garcia, Enio L. R. Brito, Priscila Serpa, Joana Gregory, Claudio Natalini, Rodrigo C. Mattos and Maria Inês M. Jobim

Faculdade de Veterinária – Equinos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

**Summary:** Seminal plasma (SP) proteins have been assessed in relation to reproductive fertility levels or infertility, in several species of mammals, particularly domestic animals. Horse seminal plasma proteins 1 (HSP-1) and 2 (HSP-2) are the most abundant proteins in equine seminal plasma. The aim of this study was to investigate in adult stallions the concentrations of seminal plasma HSP-1/2 and total protein in the breeding season and non-breeding season and to determine if these concentrations were related with fertility. Seminal plasma was obtained from 42 ejaculates of 11 adult stallions (3–25 yrs). Stallions were allocated into two groups (good and poor fertility) according to pregnancy rates of mares, and to their semen viability data in the first collection day. Seminal plasma HSP-1/2 concentrations (mg/mL) were measured and analyzed by an Ultra High Performance Liquid Chromatography using a UHPLC column. There were significant differences ( $P < 0.05$ ) in total protein and HSP1/2 concentration (mg/mL, mean  $\pm$  SD) in the ejaculates from good and poor fertility stallions. The HSP1/2 concentration did not show differences in the first and second ejaculates of good fertility stallions in both the non-breeding and breeding season. Seminal plasma of stallions classified as poor fertility showed significant difference ( $P < 0.05$ ) in HSP-1/2 concentration between the first and second ejaculate in both the non-breeding and breeding season. In conclusion, the concentration of the major proteins of stallion seminal plasma HSP1/2 was higher in ejaculates from stallions with poor fertility, is not influenced by the season and could serve as biomarker for poor fertility in stallions.

Keywords: stallion / UHPLC / breeding season / seminal plasma / reproduction

### Ist die Konzentration der Sperma-Plasmaproteine HSP-1 und HSP-2 des Pferdes ein möglicher Marker für mangelhafte Fruchtbarkeit?

Die Proteine des Seminalplasmas wurden im Zusammenhang mit dem Fruchtbarkeits- oder Unfruchtbarkeitslevel diverser Säugetiere, speziell der Haustiere, bewertet. Die "Horse Seminal Plasma" Proteine 1 (HSP-1) und 2 (HSP-2) sind die am meisten vorkommenden Proteine im Seminalplasma von Pferden. Ziel der Studie war es, die Konzentration des Seminalplasmas HSP-1/2 und die gesamten Proteine bei erwachsenen Hengsten, während und außerhalb der Decksaison zu untersuchen und festzustellen, ob diese Konzentrationen mit der Fruchtbarkeit zusammenhängen. Seminalplasma wurden aus 42 Ejakulaten von 11 erwachsenen Hengsten (3–25 Jahre) gewonnen. Die Hengste wurden in zwei Gruppen aufgeteilt (hohe und niedrige Fruchtbarkeit) gemäß der Trächtigkeitsrate der Stuten und der Viabilität des Samens in der Samenentnahme des ersten Tages. Samenplasma wurde aus 42 Ejakulaten gewonnen und die Konzentration von HSP-1/2 (mg/mL) wurden mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Anwendungen einer UHPLC Trennsäule gemessen und analysiert. Es wurden signifikante Unterschiede ( $P < 0.05$ ) in der Konzentration der gesamten und der HSP1/2 Proteine (mg/mL, Durchschnitt  $\pm$  SD) im Ejakulat der Hengste mit hohen und niedrigen Fruchtbarkeit festgestellt. Die HSP1/2 Konzentration der Hengste mit hoher Fertilität zeigte keinen Unterschied im ersten und zweiten Ejakulat sowohl während als auch außerhalb der Decksaison. Seminalplasma, der mit niedriger Fertilität eingestuft Hengste, zeigten einen signifikanten Unterschied ( $P < 0.05$ ) zwischen dem ersten und zweiten Ejakulat sowohl innerhalb als auch außerhalb der Decksaison. Abschließend wurde festgestellt, dass die HPS1/2 Konzentration, die am häufigsten vorkommende Proteine, höher im Ejakulat der Hengste mit niedriger Fertilität war, diese nicht durch die Saison beeinflusst wurde und kann als Biomarker geringer Fertilität eingesetzt werden.

**Schlüsselwörter:** Hengst / UHPLC / Decksaison / Seminalplasma / Reproduktion

**Citation:** L. A. D. Garcia, E. L. R. Brito, P. Serpa, J. Gregory, C. Natalini, R. C. Mattos, M. I. M. Jobim (2014) Horse Seminal Plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility? *Pferdeheilkunde* 30, 557-560

**Correspondence:** Maria Inês Mascarenhas Jobim, PPGMA, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, E-mail: Inês.jobim@ufrgs.br

### Introduction

Progress has been made in developing reliable indicators of ejaculate quality that allow exclusion of low-quality ejaculates for use in natural breeding or artificial insemination. Physical semen characteristics and sperm morphology measurements allow detection of the stallions most likely to be fertile. However, some of them are or became subfertile despite acceptable results of the conventional breeding soundness examination (*Barrier-Battut et al. 2005*). The ability to select these fertile stallions or predict fertility using biomarkers is a promising goal. Accurate or predictive genetic and protein markers are still needed.

The suggested functions of seminal plasma proteins include their involvement in several essential steps preceding fertilization, such as regulating sperm capacitation, establishment of the oviductal sperm reservoir, modulation of the uterine immune response and sperm transport in the female genital tract, as well as in gamete interaction and fusion (*Töpfer-Petersen et al. 2005*).

Seminal plasma (SP) proteins have been assessed in relation to reproductive fertility levels or infertility, in several species of mammals, particularly domestic animals. SP proteins have been identified as associated with high and low fertility in bulls (*Killian et al. 1993*) isolated as osteopontin (OPN) and

lipocalin-type prostaglandin D synthase respectively (Cancel et al. 1997, Gerena et al. 1998). The latter has been always present in the sperm-rich fraction of ejaculates in species with fractionated ejaculation. OPN has been related to fertility in pigs (Hao et al. 2006, Hao et al. 2008) and stallions (Brandon et al. 1999). Jobim et al. (2005) observed one protein (20–25 kDa, pI 8.5–8.7) present only in the ejaculates of high fertility stallions and another protein (25–30 kDa, pI 7.5–7.7) that had higher relative protein content in ejaculates of low fertility stallions. More recently, the abundance of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP3) was positively related to first cycle conception rate and the abundance of four seminal plasma proteins were identified as being negatively related to fertility; these were identified as kallikrein-1E2 (KLK2), clusterin, and seminal plasma proteins 1 (SP1) and 2 (SP2) (Novak et al. 2010).

Horse seminal plasma proteins 1 (HSP-1) and 2 (HSP-2); recently, renamed SP-1 and SP-2, respectively are the most abundant proteins in equine seminal plasma, accounting for 70–80% of the total proteins (Calvete et al. 1994). They showed heparin-binding ability (Calvete et al. 1994) and were found to be associated to the sperm surface, indicating a potential role in fertilization (Töpfer-Petersen et al. 2005). They belong to the short seminal Fn-2 type proteins (Calvete et al. 1995 and Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005) and are the equine orthologs to the major bovine heparin-binding proteins (BSP), which have been shown to be involved in early fertilization steps (capacitation).

The season of the year influences many of the physical and chemical characteristics of stallion semen as well as fertility (Pickett et al. 1975). The influence of season on the total protein concentration and the composition of seminal plasma of many species has been described in the ram (Perez-Pé et al. 2001, Cardozo et al. 2006), boar (Trudeau et al. 1986, Strzpek 2002) and horse (Janett et al. 2003), with significant differences between breeding and non-breeding seasons.

The aim of this study was to investigate in adult stallions the concentrations of seminal plasma HSP-1/2 and total protein in the breeding season and non-breeding season and to determine if these concentrations were related with fertility.

## Material and methods

### Animals and Samples Collection

Seminal plasma was obtained from 11 adult stallions (3–25 yrs) from commercial herds in the State of Rio Grande do Sul, Brazil (30° 16' 57" latitude south and 55° 53' 47" longitude west at 145 meters above sea level). Data were collected during the non-breeding season (winter and spring months) and the breeding season (summer months). Stallions were maintained under similar handling and feeding conditions, kept free in pastures. They were allocated into two groups (good and poor fertility; Giesecke et al. 2010) according to pregnancy rates of mares assessed by veterinary and to their semen viability data in the first collection day. Stallions of good fertility (n = 6) had a minimum of 65% of pregnancy rates during the 2-year period and more than  $1.5 \times 10^9$  viable sperm. Stallions classified as poor fertility (n = 5) had no

more than 55% of pregnancy rates and less than  $1.4 \times 10^9$  viable sperm. Sperm viability (SV) was calculated using the following formula:  $SV = \text{progressive sperm motility} \times \text{morphologically normal sperm} \times \text{sperm concentration}$ .

Two ejaculates were collected by artificial vagina from each stallion in the breeding season and non-breeding season with one hour of interval. One of the poor fertility stallion die during the experiment and was not collected in the breeding season. A total of 42 ejaculates from 11 stallions were used. After collection and analysis, a 2.0 mL aliquot of semen was centrifuged at  $1,500 \times g$  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. Frozen samples were thawed, recentrifuged at  $10,000 \times g$  for 60 min at 4°C and 50 µL were taken from the supernatant and transferred to cryovials for storage at -80°C.

### Semen Collection and Evaluation

After collection, gel-free semen was taken to evaluate for volume, sperm motility, sperm concentration, and percent of morphologically normal sperm, according to conventional semen analysis described by Sieme et al. (2001).

### Total Protein Concentration

Protein concentration in seminal plasma from each sample was assessed according to the method described by Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin (1 mg/mL) as a standard.

### HSP-1/2 Concentrations

Seminal plasma HSP-1/2 concentrations (mg/mL) were measured according to the method described by Calvete et al. (1997) with modification (trifluoroacetic acid was replaced by trichloroacetic acid as one of the mobile phases for chromatography analyses). The samples were defrosted at room temperature, filtered in 0.22 µm filters (Biofil Syringe Filter) and analyzed by an Ultra High Performance Liquid Chromatography using a Thermo Fisher Scientific UHPLC column (Hypersil Gold AX 50 × 2.1 mm, 1.9 micron pore) eluted at 1 mL/min with a gradient of 0.1% (v/v) trichloroacetic acid in (A) water and (B) acetonitrile as follows: isocratically with 25% B for 5 min, followed by 25–30% B for 5 min, and 30–70% B for 160 min. Proteins were detected at 220 nm. Integration of the sample curves with the calibration curve was done with ChromQuest® and values for the HSP-1/2 protein concentration were attained. The calibration curve was obtained with HSP-1/2 purified kindly provided by Dr. J. J. Calvete (Instituto de Biomedicina de Valencia, Spain).

### Statistical analysis

Data were analyzed using Statistical Analysis Software (SAS®). Analysis of variance (GLM—General Linear Model) was performed to compare (among fertility groups) the HSP-1/2 and total protein concentration in the first and second ejaculate from

good and poor fertility stallions measured in the non-breeding and breeding season. The Tukey post hoc test was used to locate differences and  $P < 0.05$  was regarded as significant.

## Results

Overall pregnancy rates ranged from 66–100% in stallions of good fertility and from 0–53% in stallions of poor fertility. In two samples from the good fertility group and in one sample from the poor fertility group HSP1/2 detection was not possible. HSP-1/2 ( $n = 39$  ejaculates) and total protein concentration ( $n = 42$  ejaculates) (mean  $\pm$  SD) from stallion with good and poor fertility are shown in Figure 1. There were differences ( $P < 0.05$ ) in total protein and HSP1/2 concentration (mg/mL, mean  $\pm$  SD) in the ejaculates from good and poor fertility stallions. HSP-1/2 accounting for 80% of the total proteins in the samples of stallions of good fertility, while that HSP-1/2 accounting for 93% of the total proteins in stallions classified as poor fertility. Results of HSP-1/2 concentration (mg/mL, mean  $\pm$  SD) in the first and second ejaculate from good and poor fertility stallions measured in the non-breeding and breeding season are shown in Table 1. There were no differences ( $P > 0.05$ ) in HSP-1/2 concentration among adult stallion ages (3–25yrs).

## Discussion

As a part of the fertilization process, seminal plasma proteins play an important role in sperm reservoir formation, sperm capacitation, and sperm-oocyte interactions (Foxcroft et al. 2008, Rodríguez-Martínez et al. 2008). Specific seminal plasma proteins have previously been identified as potential mar-

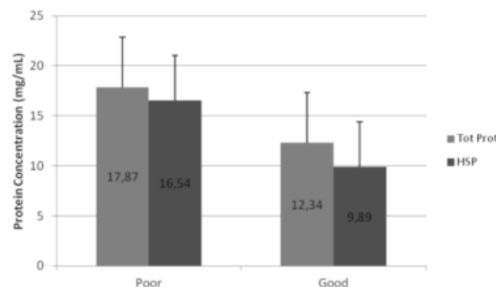


Fig. 1 HSP-1/2 ( $n = 39$  ejaculates) and total protein ( $n = 42$  ejaculates) concentration (mean  $\pm$  SD) from stallion with good and poor fertility. Different superscripts indicate differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 1** HSP-1/2 concentration (mg/mL, mean  $\pm$  SE) in the first and second ejaculate from stallions with good ( $n = 6$ ) and poor ( $n = 5$ ) fertility measured in the non-breeding and breeding season.

Fertility	non-breeding				breeding			
	Ejaculates							
	1		2		1		2	
Good	10.97 $\pm$ 1.19 <sup>Aa</sup> $n = 6$		8.31 $\pm$ 0.82 <sup>Aa</sup> $n = 6$		10.98 $\pm$ 1.81 <sup>Aa</sup> $n = 5$		9.40 $\pm$ 2.04 <sup>Aa</sup> $n = 5$	
Poor	19.99 $\pm$ 1.21 <sup>Ba</sup> $n = 5$		13.51 $\pm$ 0.79 <sup>Bb</sup> $n = 4$		23.99 $\pm$ 1.80 <sup>Ba</sup> $n = 4$		13.77 $\pm$ 1.33 <sup>Bb</sup> $n = 4$	

<sup>A,B</sup> Column values with different superscripts indicates significant difference ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,b</sup> Row values with different superscripts indicates significant difference ( $P < 0.05$ ).

kers of male fertility in the bull (Killian et al. 1993) and stallion (Brandon et al. 1999, Novak et al. 2010). The present study investigated seminal plasma HSP-1/2 concentration to determine if these concentrations are related with stallion fertility in vivo, providing the basis to use them as a complementary tool to identify sires with high and low relative fertility that could have a considerable impact on reproductive efficiency.

The highest values of HSP-1/2 concentration were found in the ejaculates from stallions with poor fertility in the non-breeding and breeding season. This is consistent with previous findings of Novak et al. (2010) in the breeding season. HSP-1/2 shares significant homology with PDC-109 (Calvete et al. 1995) and this protein at higher concentrations induces membrane permeabilisation (Gasset et al. 1997), stimulates cholesterol and phosphatidylcholine efflux (Therien et al. 1999), and also acts in the perturbation of the membrane integrity (Calvete et al. 2007). Perhaps the greater amount of HSP-1/2 in seminal plasma, as detected in samples from stallions with poor fertility, had the same negative effect as PDC-109 above mentioned. HSP-1/2 exhibits chaperone-like activity and may protect other proteins of equine seminal plasma against misfolding, unfolding or aggregation (Sankhal et al. 2012). The structure of HSP-1/2 is largely unordered and it is likely that this structural plasticity helps it to interact with other seminal plasma proteins effectively and protect them under stress conditions. Probably the values observed in the poor fertility stallions were related with a stress condition with production of other proteins that stimulates the high concentration of HSP-1/2.

Additionally, the proteins HSP1/2 were hypothesized to be similar to a sperm motility inhibitor protein (SPMI, 18-22 kDa) originating from the seminal vesicles (Brandon et al. 1999). The HSP-1/2 comprised 80% of the total proteins in the samples of stallions of good fertility which agree with the results of Calvete et al. (1994) that observed two major proteins, the heparin-binding HSP-1 and HSP-2, accounted for 70–80% of the total seminal plasma protein. However an increase in HSP-1/2 concentration was observed in samples of seminal plasma of stallions classified as poor fertility. The findings of Calvete et al. (1994) come only from healthy reproductively active stallions while in this study were used stallions of good and poor fertility. Total protein concentration showed the same pattern found for HSP-1/2 concentration because these proteins together account for 70–80% of the total proteins in stallion seminal plasma (Calvete et al. 1994).

The HSP 1/2 show higher concentration in the ejaculates from stallions in the poor fertility group, in the first and second eja-

culate in the non-breeding season and in the first ejaculate in the breeding season in comparison with the good fertility group. In contrast, the second ejaculate in breeding season not shown to vary between the fertility groups. Perhaps the increase in the ejaculations number of the stallions during the breeding season may have an effect in the amount of HSP1/2 without variation between fertility groups in the second ejaculate.

The HSP1/2 concentration did not show differences in the first and second ejaculates of good fertility stallions in both the non-breeding and breeding season, indicating uniformity in their concentrations. On the other hand, HSP-1/2 concentration observed in samples of seminal plasma of stallions classified as poor fertility showed difference between the first and second ejaculate in both the non-breeding and breeding season.

In conclusion, the concentration of the major proteins of stallion seminal plasma HSP1/2 was higher in ejaculates from stallions with poor fertility, is not influenced by the season and could serve as biomarker for poor fertility in stallions.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Juan J. Calvete (Instituto de Biomedicina de Valencia, Valencia, Spain) for supply the HSP-1/2 purified and to CNPq, CAPES and FAPERGS for funding this study.

#### Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

#### Animal welfare statement

Statement 23850, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

#### References

- Barrier-Battut J. L., Dacheux J. L., Gatti P., Rouviere C., Stanciu F., Dacheux M. (2005) Seminal plasma proteins and semen characteristics in relation with fertility in stallions. Proceedings of the 4th International Symposium on Stallion Reproduction 89. Animal Reproduction Science. Issues 1-4, 255-258
- Brandon C. I., Heusner G. L., Caudle A. B., Fayrer-Hosken R. A. (1999) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52, 863-873
- Calvete J. J., Nessau S., Mann K., Sanz L., Sieme H., Klug E., Töpfer-Petersen E. (1994) Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. *Reprod. Domest. Anim.* 29, 411-426
- Calvete J. J., Mann K., Schafer W., Sanz L., Reinert M., Nessau S., Töpfer-Petersen E. (1995) 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.* 310, 615-622
- Calvete J. J., Raida M., Gentzel M., Urbanke C., Sanz L., Töpfer-Petersen E. (1997) Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett.* 407, 201-206
- Calvete J. J., Sanz L. (2007) Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 201-215
- Cancel A. M., Chapman D. A., Killian G. J. (1997) Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 57, 1293-1301
- Cardozo J. A., Fernandez-Juan M. F., Forcada A., Abecia T., Muino-Blanco J. A., Cebrian-Perez J. A. (2006) Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 66, 841-850
- Ekhlasi-Hundrieser M., Schafer B., Kirchoff C., Hess O., Bellair S., Müller P., Töpfer-Petersen E. (2005) Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 45-57
- Foxcroft G. R., Dyck M. K., Ruiz-Sanchez A., Novak S., Dixon W. T. (2008) Identifying useable semen. *Theriogenology* 70, 1324-1336
- Gasset M., Saiz J. L., Laynez J., Sanz L., Gentzel M., Töpfer-Petersen E., Calvete J. J. (1997) Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *Eur. J. Biochem.* 250, 735-744
- Gerena R. L., Irikura D., Urade Y., Eguchi N., Chapman D. A., Killian G. J. (1998) Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.* 58, 826-833
- Giesecke K., Hamann H., Sieme H., Distl O. (2010) INHBA-associated markers as candidates for stallion fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 342-347
- Hao Y., Mathialagan N., Walters E., Mao J., Lai L., Becker D., Li W., Critser J., Prather R. S. (2006) Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 75, 726-733
- Hao Y., Murphy C. N., Spate L., Wax D., Zhong Z., Samuel M., Mathialagan N., Schatten H., Prather R. S. (2008) Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 291-298
- Janett F., Thun R., Niederer K., Burger D., Hässig M. (2003) Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood Stallion. *Theriogenology* 60, 453-461
- Jobim M. I. M., Bustamante Filho I. C., Trein C. R., Wald V. B., Gregory R. M., Mattos R. C. (2005) Equine seminal plasma proteins related with fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 305-308
- Killian G. J., Chapman D. A., Rogowski L. A. (1993) Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 49, 1202-1207
- Lowry O. H., Rosebrough W. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Novak S., Smith T. A., Paradis L., Burwash M. K., Ruiz-Sanchez A., Dyck M. K., Foxcroft G. R., Dixon W. T. (2010) Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* 74, 956-967
- Perez-Pe R., Barrios B., Muino-Blanco T., Cebrian-Perez J. A. (2001) Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J. Chromatogr. B.* 760, 113-121
- Pickett B. W., Faulkner L. C., Voss J. L. (1975) Effect of season on some characteristics stallion semen. *J. Reprod. Fertil.* 23, 25-28
- Rodriguez-Martinez H., Saravia F., Wallgren M., Roca J., Pena F. J. (2008) Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 70, 1242-1250
- Sankhala R. S., Kumar C. S., Singh B. P., Arangasamy A., Swamy M. J. (2012). HSP-1/2, a major protein of equine seminal plasma, exhibits chaperone-like activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 427, 18-23
- Sieme H., Töpfer-Petersen E., Bader H., Petzoldt R., Merkt H. (2001) A.I.- sperm of the Stallion. Evaluation criteria and minimal standards – a survey. *Pferdeheilkunde* 17, 145-154
- Strzezek J. (2002) Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod. Biol.* 3, 243-266
- Therien I., Moreau R., Manjunath P. (1999) Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 59, 768-776
- Töpfer-Petersen E., Ekhlasi-Hundrieser M., Kirchoff C., Leeb T., Sieme H. (2005) The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 159-170
- Trudeau V., Sanford L. M. (1986) Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace boar. *J. Anim. Sci.* 63, 1211-1219