

Proteínas do sêmen do cão são importantes ou não na fertilização?¹

Are canine seminal proteins important or not in the fertilization?

Fabiana F. de Souza

UNIFRAN, Universidade de Franca, Franca, SP; FertCani – Serviço Veterinário Especializado em Reprodução de Cães e Gatos, Botucatu, SP, Brasil

Resumo

Proteínas presentes no plasma seminal se ligam à membrana espermática durante a ejaculação e podem ser determinantes da fertilidade de um macho. No cão, poucos estudos têm demonstrado seus efeitos nas características seminais e na fertilidade, porém em várias outras espécies tem sido demonstrada a importância de diferentes proteínas na fertilização. Estudos das proteínas do plasma seminal ou na membrana espermática podem ser úteis na identificação de animais férteis, na elaboração de aditivos seminais e de contraceptivos. Ademais, informações obtidas a respeito da fisiologia da célula espermática e do envolvimento das proteínas na fertilidade de cães podem ser aplicadas à biotecnologia da reprodução de animais silvestres.

Palavras-chave: cão, proteína, plasma-seminal, membrana-espermática.

Abstract

Proteins present in the seminal plasma bind to the sperm membrane during ejaculation and can be to determine the fertility of a male. In the dog, few studies have demonstrated its effect in the seminal characteristics and fertility, however in some species have been demonstrated the importance of different proteins in the fertilization. Studies of proteins from seminal plasma seminal or sperm membrane can be useful in the identification of fertile animals, in the contraceptive and seminal additive elaboration. Moreover, information regarding the spermatid cell physiology cell and involvement of proteins in the fertility of dogs can be applied to reproductive biotechnology of wild animals.

Keywords: dog, protein, seminal-plasma, sperm-membrane

A avaliação do ejaculado é de primordial importância para determinar a qualidade do sêmen e, desta forma, obter sucesso com IA. Técnicas disponíveis são capazes de diagnosticar infertilidade ou subfertilidade e deveriam ser empregadas como exame de rotina em todos os machos. Em algumas espécies, como a bovina e a humana, estudos do perfil protéico do plasma seminal, têm correlacionado a presença de certas proteínas à baixa ou alta fertilidade, e a congelabilidade do sêmen. Contudo, a análise do sêmen total continua sendo um teste laboratorial inicial para determinar a fertilidade do macho, apesar de ser de valor duvidoso (Ayyagari *et al.*, 1987).

A preservação dos gametas está condicionada aos conhecimentos da bioquímica espermática e a estudos dos componentes dos líquidos seminais e, principalmente, a sua interação com o meio e com o próprio espermatozoide (Coulter, 1992).

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozoides, que compõe menos que 1% do volume total e o plasma seminal. A principal função do plasma seminal é servir como meio de transporte e sustentação para os espermatozoides (Wite, 1988). É o produto das secreções dos tecidos acessórios sexuais, como o epidídimo, ducto deferente, ampola, vesícula seminal, próstata, glândula bulbouretral ou de Cowper e glândula de Littre ou glândulas uretrais, em resposta à testosterona (Wite, 1988, Parrish e First, 1993). No cão, o plasma seminal é composto pelas secreções dos ductos ejaculatórios e da próstata, única glândula sexual acessória, nesta espécie (Johnston *et al.*, 2001). A função destas secreções, no processo de fertilização, ainda é duvidosa. Muitos estudos têm questionado sua necessidade no processo de fertilização, já que, em algumas espécies, os espermatozoides do epidídimo são capazes de fertilizar o ovócito, ou seja, sem nenhum contato com o produto de secreção destas glândulas. O plasma seminal pode não conter fatores, extremamente, essenciais para a fertilização, mas as secreções podem proporcionar condições favoráveis à motilidade espermática, sobrevivência e transporte dos espermatozoides, tanto no trato reprodutor masculino, como no feminino (Ewing e Chang, 1986).

As interações entre as células espermáticas e o fluido seminal iniciam-se desde a espermatogênese. Porém, durante a passagem pelo epidídimo, a membrana plasmática dos espermatozoides sofre extensas alterações biológicas devido a sua interação com meio (Tulsiani *et al.*, 1997, Naaby-Hansen *et al.*, 1997). Como os espermatozoides perdem toda a capacidade de sintetizar e secretar proteínas na espermatogênese

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

(Shabanowitz e Killian, 1987), novas proteínas são aderidas às células espermáticas, durante a maturação no epidídimo. Todas as modificações na membrana plasmática, durante esta maturação, regulam a capacidade espermática para movimentação e ligação à zona pelúcida (Varricchio *et al.*, 1996).

Dois eventos principais estão relacionados à fertilização do gameta feminino. A capacitação espermática e a reação do acrossomo. As alterações iniciais na membrana plasmática, durante o processo de capacitação, envolvem a remoção periférica de proteínas de origem epididimal e/ou do plasma seminal, os fatores de decapacitação, que podem restringir o movimento de proteínas e lipídeos através da membrana. Posteriormente, ocorre um aumento na proporção de colesterol: fosfolipídeos (PARRISH e FIRST, 1993) e consequentes modificações nos canais iônicos, induzindo o influxo transmembrana de íons metais, principalmente o cálcio (Ca^{+2}) (Holt, 1984, Wolf *et al.*, 1992, Manjunath *et al.*, 1993a, Tulsiani *et al.*, 1997). A membrana se torna mais instável, propiciando a fusão da membrana plasmática à membrana acrossomal, formando vesiculações. Estes acontecimentos promovem a liberação das enzimas acrossomais, por exocitose, que proporcionarão a fertilização do ovócito. Estes processos estão, diretamente, correlacionados às interações do plasma seminal, célula espermática e o fluido do trato reprodutor feminino (Parrish e First, 1993).

O plasma seminal é um meio isotônico e neutro que representa grande interesse bioquímico, pois apresenta compostos inorgânicos que não são encontrados em outras partes do organismo em concentrações tão elevadas (Wite, 1988).

Durante muitos anos, o plasma seminal foi considerado apenas um meio de transporte e sustentação às células espermáticas. Atualmente, estudos adicionando plasma seminal de machos de alta fertilidade às células espermáticas de machos de baixa fertilidade, têm provado a importância deste fluido na fertilidade *in vivo* (Aurich *et al.*, 1996, Rodrigues *et al.*, 1999).

O plasma seminal apresenta diversos fatores relacionados à inibição da capacitação, conhecidos como fatores de decapacitação. A princípio, acreditava-se que estes fatores tinham um papel prejudicial na fertilização, entretanto, a prevenção da capacitação, até o momento que o espermatozóide encontra o ovócito, é essencial para que a fertilização ocorra. Obviamente, na fertilização *in vivo*, mecanismos previnem o transporte do plasma seminal até o sítio de fertilização (Kanwar *et al.*, 1979) e elementos presentes neste microambiente são capazes de auxiliar na remoção de tal fatores (Manjunath *et al.*, 1993a).

O conteúdo protéico do plasma seminal de mamíferos varia de 3 a 7%, dependendo da espécie (Wite, 1988). No cão, o conteúdo médio de proteínas totais do plasma seminal é de 1,09 g/dL (Isaacs *et al.*, 1980) a 2,19 g/dL (Souza *et al.*, 2007). England *et al.* (1990), verificaram que a concentração total de proteína foi, significativamente, maior na segunda fração do ejaculado canino, quando comparada à primeira. Os valores médios encontrados foram de 1,44 g/dL e 4,25 g/dL, respectivamente, para a primeira e segunda frações. O valor de proteína total observada na terceira fração foi de 3,07 g/dL.

Os primeiros estudos de separação de proteínas do plasma seminal de mamíferos, por eletroforese, foram realizados na década de 50 (Larson e Salisbury, 1954). Nesta mesma época, propôs-se a correlação entre os elementos protéicos e a qualidade espermática (Bertok e Pasztor, 1957). Atualmente, com o avanço das técnicas de biologia molecular, muitas proteínas foram identificadas e caracterizadas (Ayyagari *et al.*, 1987, Killian *et al.*, 1993, Frazer e Bucci, 1996, Moreau e Manjunath, 1999, Roncoletta *et al.*, 2006).

Em bovinos Killian *et al.* (1993) estudou as proteínas do plasma seminal de touros por eletroforese em gel de poliacrilamida e sugeriu a existência de 4 proteínas associadas à fertilidade. Duas destas proteínas, 26 kDa (pI 6,2) e 55 kDa (pI 4,5), foram associadas com touros de alta fertilidade, enquanto outras duas, 16 kDa (pI 4,1 e 6,7, respectivamente), foram mais frequentes em touros de baixa fertilidade. Valores estimados de fertilidade, baseado nestas proteínas e utilizando um modelo de regressão, foram comparados à fertilidade *in vivo* e encontrou-se uma correlação positiva ($r = 0,89$), indicando que este modelo foi válido. Em estudo subsequente, a proteína de 55 kDa (pI 4,5) do plasma seminal bovino foi identificada como uma osteopontina (CANCEL *et al.*, 1997) e a de 26 kDa (pI 6,2) como uma “lipocalin-type prostaglandin-D synthase” (Gerena *et al.*, 1998).

Em cães, a SP-1 (72 kDa, pI 5,6), uma proteína do plasma seminal foi positivamente correlacionada à fertilidade, enquanto a SP-2 (75 kDa, pI 6,0), SP-3 (18 kDa, pI 4,3), e SP-4 (16 kDa, pI 6,5) foram, negativamente, correlacionadas à fertilidade. Baseado em análises por “western blot”, determinaram uma similaridade entre a SP-1 e a proteínas bovina (55 kDa, pI 4,5), previamente descrita (Brandon *et al.*, 1999). Em cães, anticorpos contra a osteopontina marcaram, no “western blot”, duas bandas protéicas (77,2 kDa e 15,6 kDa) do plasma seminal, separadas pela eletroforese unidimensional. E na membrana espermática, foram marcadas 12 bandas (70,6 kDa a 26,6 kDa), porém 3 foram, fortemente, marcadas (46,4 kDa, 37,7 kDa e 36,5 kDa) (Souza *et al.*, 2007, dados não publicados).

Proteínas do plasma seminal e da membrana espermática de cães não têm sido bem caracterizadas. Dois estudos usando a eletroforese (Dubiel, 1974, Bruschi *et al.*, 1979), identificaram 3 frações protéicas no plasma seminal desta espécie. No trabalho de Dubiel (1974) estas 3 frações partiram de uma única linha e migraram ao pólo negativo da placa, na área das gama-globulinas. Os cães com reduzida fertilidade também apresentaram as 3 frações, sendo que a migração e a concentração de proteínas foi idêntica a encontrada no plasma seminal de cães férteis. Contudo, ejaculados de cães idosos, com azoospermia não se separaram em 3 frações, mas

permaneceram como uma única fração com distância variável da linha inicial, tornando-se difusa através do catodo. Bruschi *et al.* (1979) relatou as 3 frações protéicas, porém não determinou associação entre as proteínas, a fertilidade ou a análise seminal.

Posteriormente, Stubbs e Resnick (1978) estudaram a composição protéica da secreção prostática canina, a qual constitui o plasma seminal desta espécie e identificaram 6 bandas de proteína (86 kDa, 73 kDa, 28 kDa, 25 kDa, 19 kDa, e 16 kDa). Neste estudo, a banda de 86 kDa estava presente apenas em cães castrado. Mais recentemente, um estudo identificou 25 bandas de proteínas, no plasma seminal de 5 cães de fertilidade desconhecida, com peso molecular variando de 3,5 a 136 kDa (Souza e Lopes, 2002).

Souza *et al.* (2007), estudando um número maior de animais (n=20) identificaram 37 bandas no plasma seminal. Os pesos moleculares variaram entre 100,6 kDa a 3,6 kDa, sendo 13 bandas (49,7 kDa, 33,2 kDa, 26,4 kDa, 19,5 kDa, 15,6 kDa, 13,5 kDa, 12,7 kDa, 11,7 kDa, 10,5 kDa, 8,7 kDa, 7,8 kDa, 5,6 kDa e 4,9 kDa) presentes em todos os cães. A maioria (85%) das bandas apresentaram pesos moleculares abaixo de 17 kDa, sendo a banda 15,6 kDa presente em altas concentrações em todos os animais. Neste estudo, existiu uma correlação positiva entre a IOD (densidade óptica integrada) de 2 bandas (67 kDa e 58,6 kDa) e parâmetros avaliados no sêmen, tais como motilidade e vigor espermático, porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais, teste hiposmótico, coloração com sondas fluorescentes (6-diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio). Além disso, estes autores sugeriram que a banda de 15,6 kDa, encontrada em alta concentração no plasma seminal de todos os cães estudados, seria uma subunidade da arginina esterase.

A arginina esterase, conhecida como proteína específica prostática canina (CPSE), é uma proteína com ação enzimática encontrada em altas concentrações no líquido prostático canino (~10 ng/mL) (McEntee *et al.*, 1987, Frenette *et al.*, 1985a); perfaz mais de 90% das proteínas secretadas pela próstata do cão e em torno de 30% das proteínas do plasma seminal (Dubé, 1994). É produzida pelo epitélio prostático e sua secreção depende, estritamente, de andrógenos (Frenette *et al.*, 1987). O significado *in vivo* da sua atividade proteolítica ainda permanece desconhecido. Alguns autores sustentam a hipótese de que esta protease se liga ao espermatozóide; assim, a enzima poderia catalisar proteínas na superfície espermática ou poderia ser transportada como proteína “ligada” e agir em sítios distantes (Dubé, 1994). Frenette *et al.* (1985b) sugeriram que o possível alvo da CPSE é a cauda do espermatozóide, no qual a enzima já foi detectada por imunofluorescência. A CPSE pode estar ativa dentro dos grânulos secretórios da próstata do cão e pode hidrolisar substrato protéico contido nesta organela (Frenette *et al.*, 1985a). Outros estudos demonstraram que esta proteína foi capaz de hidrolisar o muco cervical na fêmea e pode estar ligada à regulação da motilidade das tubas uterinas e útero, durante o processo de fertilização. Essa proteína pertence à família das caliceínas, podendo estar relacionada à clivagem do cininogênio em cinina, que é um potente fator vasoativo (Dubé *et al.*, 1986).

O peso molecular da CPSE do plasma seminal é estimado em 29,5 kDa por filtração em gel (Sephadex G-100) e em 25 kDa por SDS-PAGE, na ausência de mercapetanol (Chapdelaine *et al.*, 1984). Sob condições desnaturantes, a proteína é formada por 2 subunidades H e L, com pesos moleculares de 15 kDa e 12 kDa a 14 kDa, respectivamente (Isaacs e Shaper, 1985). Embora, Souza *et al.* (2007) não tenham estudado a homologia entre a banda de 15,6 kDa e a arginina esterase a suposição de que esta banda seja uma de suas subunidades pode ser verdadeira, já que esta banda foi a mais abundante no plasma seminal dos cães estudados, por SDS-PAGE, sob condições desnaturantes, e seu peso molecular é semelhante a uma das subunidades da arginina esterase descrita na literatura.

A despeito disso, a arginina esterase é considerada um marcador imunológico da glândula prostática normal de cães (McEntee *et al.*, 1987) e apresenta alta similaridade ao PSA (Prostatic Specific Antigen) humano, um importante marcador de câncer de próstata (Dubé *et al.*, 1986). Além disso, a arginina esterase tem considerável homologia com uma família de proteínas ligadoras de heparina (HBPs) de eqüinos (SSPs-7) (Calvete *et al.*, 1995). A banda de 15,6 kDa, encontrada por Souza *et al.* (2007) foi caracterizada, anteriormente, como uma proteína ligadora de heparina (Souza *et al.*, 2006). Estes dados promovem uma adicional evidência que esta banda de 15,6 kDa seja uma das subunidades da arginina esterase; entretanto, é necessário uma confirmação por métodos mais específicos.

Proteínas ligadoras de heparina têm sido associadas à fertilidade em algumas espécies (SOUZA *et al.*, 2006, (Dott *et al.*, 1979, Frazer e Bucci, 1996, Souza *et al.*, 2006). As HBPs, secretadas pelas glândulas sexuais acessórias, estão presentes no plasma seminal. Estas proteínas se ligam à membrana espermática e são ligadoras de heparina e de glicosaminoglicanas (GAGs). As GAGs, são proteínas, estruturalmente, semelhantes a heparina e estão presentes na zona pelúcida e em algumas porções do trato reprodutor. Acredita-se que as HBPs participam do processo de fertilização, ligando-se as GAGs, assim como a heparina, e outras proteínas do trato reprodutor, estando, diretamente, correlacionadas ao processo de capacitação e reação do acrossomo (Miller *et al.*, 1990).

As principais proteínas ligadoras de heparina nos bovinos são denominadas BSPs (proteínas do plasma seminal bovino) (Chandonnet *et al.*, 1990), sendo consideradas as principais proteínas presentes no plasma seminal dessa espécie. Embora não se conheça, totalmente, os passos envolvidos na capacitação e na reação do

acrossomo, sabe-se que estas proteínas estão intimamente relacionadas a este processo. As BSPs, são produtos da vesícula seminal que ligam-se ao espermatozóide durante a ejaculação e as GAGs no trato reprodutor feminino (Manjunath *et al.*, 1993b). A princípio funcionam como um fator de decapacitação, ligando-se aos fosfolipídios da membrana espermática que contém o grupo fosfatidil-colina, prevenindo uma reação do acrossomo prematura. No trato reprodutor feminino, este complexo, formado na membrana espermática, liga-se as HDLs (lipoproteínas de alta densidade), o que levará a um seqüestro de colesterol e possivelmente de fosfolipídios. A perda destes lipídios pode resultar numa alteração da permeabilidade da membrana, o que promove a ativação da Fosfolipase A2, levando ao influxo de íons de cálcio para dentro da célula espermática. Este processo leva à conversão dos fosfolipídios à lisofosfolipídios, os quais desestabilizam a membrana, resultando na reação do acrossomo (Manjunath *et al.*, 1989, Chandonnet *et al.*, 1990, Manjunath *et al.*, 1993a). As BSPs são capazes de ligar-se a outras proteínas moduladoras da fertilização, tais como a apolipoproteína A-1 (apoA-1), a apoA-1 associada à HDL (Manjunath *et al.*, 1989) e a calmodulina (Manjunath *et al.*, 1993a).

Em touros uma proteína ligadora de heparina de 30 kDa, denominada de “fertility-associated antigen” (FAA) é encontrada da membrana espermática de machos de alto potencial de fertilidade (Bellin *et al.*, 1996, 1998). Touros com maior fertilidade produzem espermatozoides com alta capacidade de se ligar a heparina (Bellin *et al.*, 1994). Assim, touros com maior quantidade de FAA na membrana espermática apresentam maior fertilidade (87,5 vs 78,9%) comparados àqueles que foram negativos ao FAA (Bellin *et al.*, 1998). Nesta espécie está disponível, no mercado internacional, um teste para FAA (ReproTest®, ReproTec Inc., IVD Technology, Tucson, AZ, USA, www.reprotec.us). Embora estas proteínas estejam ligadas à membrana espermática, elas são secretadas pelas glândulas sexuais acessórias e se ligam à célula espermática durante a ejaculação (MILLER *et al.*, 1990). Apesar da associação entre as proteínas ligadoras de heparina de touros e a fertilidade, nenhuma estudo têm mostrado sua implicação na fertilidade de cães. O plasma seminal de cães contém 19 a 23 proteínas ligadoras de heparina (Souza *et al.*, 2006 e Souza *et al.*, 2007, dados não publicados) e a membrana espermática 19 bandas, incluindo uma banda marcada no “western blotting” pelo anticorpo anti-osteopontina bovina (Souza *et al.*, 2007, dados não publicados).

A eletroforese bidimensional foi usada para estudar as proteínas presentes no plasma seminal e na membrana espermática de cães, correlacionando os resultados com os obtidos na análise do sêmen fresco e congelado, e no teste de penetração e ligação espermática em ovócitos homólogos do sêmen congelado. Foram encontrados 179 e 87 *spots*, no plasma seminal e na membrana espermática, respectivamente. Vários *spots* demonstram correlação com diferentes parâmetros seminais, principalmente com os de motilidade do sêmen fresco e do congelado, avaliados por método computadorizado (Hamilton Thorne, IVOS 10). Um *spot* presente na membrana espermática foi correlacionado ao número de espermatozoides após a descongelação ligados/penetrados aos ovócitos (17,3 kDa, pI 9,7). Este mesmo *spot* e o de 17,6 kDa, pI 9,0 foram correlacionados a porcentagem de ovócitos interagidos no teste de ligação/penetração em ovócitos homólogos (Souza *et al.*, 2007, dados não publicados). No bovino, as proteínas do plasma seminal têm sido associadas à congelabilidade do sêmen. Roncoletta *et al.* (1999) encontrou uma proteína de plasma seminal de 61,8 kDa predominante em touros de alta congelabilidade e ausente nos touros de baixa congelabilidade. Posteriormente, uma ribonuclease de 14 kDa foi encontrada em altas concentrações no plasma seminal de touros com baixa qualidade de sêmen após a descongelação (Roncoletta *et al.*, 2002). Na membrana espermática foram encontradas 28 *spots* correlacionadas a fertilidade de touros, sendo 1 ligado a baixa fertilidade e 27 a alta fertilidade (Roncoletta *et al.*, 2006).

Kikuchi *et al.* (2003) não demonstraram uma correlação significativa entre a transferrina seminal e a concentração espermática em cães, indicando que essa proteína não é um marcador da função gonadal nos cães. Ao contrário, os níveis de lactoferrina seminal se correlacionaram ($r=0,7025$, $P<0,01$), positivamente, com a densidade espermática nos cães, sugerindo que essa proteína reflete a espermatogênese. A origem seminal da lactoferrina nos cães ainda não foi determinada. Embora, Souza *et al.* (2007) tenha verificado 2 bandas com pesos moleculares semelhantes a lactoferrina (~72.9 and 76.6 kDa), nenhuma correlação significativa com a concentração espermática foi determinada.

Proteínas presentes na membrana do espermatozóide são implicadas na fusão com o ovócito, as quais induzem à alterações na bicamada lipídica, por interação ou inserção dentro da membrana. Esta fusão ocorre, principalmente com peptídeos de seqüências curtas de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e freqüentemente, de estrutura α -helicoidal. Estas proteínas entram na bicamada lipídica em locais “alvo”, causando fusão das membranas acrossomais interna e externa, devido à desestabilização (Pecheur *et al.*, 1999). No cão, algumas destas proteínas têm sido detectadas na membrana espermática, porém sua correlação com a fertilidade ainda não foi determinada. Sauber *et al.* (2002), identificaram a PH-20 no cão, uma proteína localizada na região da cabeça de espermatozoides com acrossomo intacto, com atividade semelhante a hialuronidase. Sua função foi relacionada à penetração das células do *cumulus* e ligação à zona pelúcia, como já descrito em outras espécies (Gmachl *et al.*, 1993, Meyers *et al.*, 1997). Primakoff *et al.* (1997), obtiveram sucesso na indução de infertilidade reversível em cobaias machos, imunizados com a PH-20; estes resultados são promissores já que a proteína foi detectada no cão e poderia funcionar como um método de imun contracepção. A patente internacional de um

contraceptivo masculino utilizando a PH-20, tem sido requerida, com o propósito de imun contracepção de várias espécies, incluindo o cão (DNA encoding PH-20 proteins, <http://www.freepatentsonline.com/5721348.html>, Acesso em 27 abril 2007).

A aplicação de metodologias de estudos em biologia molecular tem revelado que diferentes moléculas estão implicadas no complexo processo de fertilização, determinando o potencial de fertilidade de um macho. Em muitas espécies, principalmente no homem e no bovino, várias proteínas têm sido identificadas como essenciais na fertilização. No cão ainda são necessários grandes avanços para que os resultados possam ser aplicados à espécie na melhoria da fertilidade, biotecnologia e possivelmente no controle populacional, se utilizadas como método contraceptivo. Obviamente, todos os avanços na fisiologia da reprodução canina implicam em avanços na fisiologia da reprodução de canídeos selvagens, proporcionando novos métodos de conservação da variabilidade genética de espécies ameaçadas de extinção. Ademais, o mapeamento das proteínas do plasma seminal e da membrana espermática poderá ser útil como um padrão de constituintes protéicos para eventos fisiológicos e patológicos que interferem no sistema reprodutor.

Referências

- Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C.** Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v.46, p.791-7, 1996.
- Ayyagari RR, Fazleabas AT, Dawood MY.** Seminal plasma proteins of fertile and infertile men analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Am J Obstet Gynecol*, v.157, p.1528-33, 1987.
- Bellin ME, Hawkins HE, Ax RL.** Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J Anim Sci*, v.72, p.2441-2448, 1994.
- Bellin ME, Hawkins HE, Oyarzo JN, Vanderboom RJ, Ax RL.** Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *J Anim Sci*, v.74, p.173-182, 1996.
- Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL.** Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci*, v.76, p.2032-2039, 1998.
- Bertok L, Pasztor L.** Paper-electrophoretic studies of seminal plasma proteins. *Acta Vet Hung*, v.7, p.439-44, 1957.
- Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA.** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, v.52, p.863-873, 1999.
- Bruschi JH, Mendes MC, Viana ES, Abreu JJ, Megale F.** Teores de ácido cítrico, frutose, proteína total e seu fracionamento eletroforético no sêmen do cão pastor alemão normal. *Arq Esc Vet UFMG*, v.31, p.13-17, 1979.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ.** Osteopontin is the 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bull. *Biol Reprod*, v.57, p.1293-1301, 1997.
- Calvete J, Sanz L, Reinert M, Dostalova Z, Topfer-Petersen E.** Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. *Mem Mus Nat Hist Nat*, v.166, p.515-524, 1995. Resumo.
- Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P.** Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev*, v.26, p.313-318, 1990.
- Chapdelaine P, Dube JY, Frenette G, Tremblay RR.** Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. *J Androl*, v.5, p.206-210, 1984.
- Coulter GH.** Bovine spermatozoa in vitro: a review of storage, fertility estimation and manipulation. *Theriogenology*, v.38, p.197-207, 1992.
- Dott HM, Harrison RAP, Foster GCA.** The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil*, p.55, p.113-124, 1979.
- Dubé JY.** Prostatic kallikreins: biochemistry and physiology. *Comp Biochem Physiol*, v.107, p.13-20, 1994.
- Dubé JY, Lazure C, Tremblay RR.** Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. *Clin Invest Med*, v.9, p.51-54, 1986.
- Dubiel A.** Electrophoretic studies of dog's semen plasma in both fertile and sterile dogs. *Pol Arch Wet*, v.17, p.699-706, 1974. Resumo.
- England GCW, Allen WE, Middleton DJ.** An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res Vet Sci*, v.49, p.66-70, 1990.
- Ewing LL, Chang TSK.** Physiology of male reproduction. In: Walsh PC et al. (Ed.). *Campbell's urology*. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.200-74.
- Frazer GS, Bucci DM.** Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, v.46, p.1389-1402, 1996.
- Frenette G, Dube JY, Lacoste D, Tremblay RR.** Radioimmunoassay in blood plasma of arginine esterase: the major secretory product of dog prostate. *Prostate*, v.10, p.145-152, 1987.

- Frenette G, Dube JY, Marcotte JR, Tremblay RR.** Arginine esterase from isolated dog prostate secretory granules is fully active enzymatically. *Can J Physiol Pharmacol*, v.63, p.1603-1607, 1985a.
- Frenette G, Dube JY, Tremblay RR.** Enzymatic characterization of arginine esterase from dog seminal plasma. *Biochim Biophys Acta*, v.838, p.270-276, 1985b.
- Gerena RL, Irikuda D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ.** Identification of a fertility associated protein in Bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthetase. *Biol Reprod*, v.58, p.826-833, 1998.
- Gmachl M, Sagan S, Ketter S, Krcil G.** The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett*, v.336, p.545-8, 1993.
- Holt WV.** Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *Int Rev Citol*, v.87, p.159-94, 1984.
- Isaacs JT, Isaacs WB, Wheaton LG, Coffey DS.** Differential effects of estrogens treatment on canine seminal plasma components. *Invest Urol*, v.17, p.495-498, 1980.
- Isaacs WB, Shaper JH.** Immunological localization and quantitation of the androgen-dependent secretory protease of the canine prostate. *Endocrinology*, v.117, p.1512-1520, 1985.
- Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS.** Breeding management and artificial insemination of the bitch. In: Canine and feline theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p.41-65.
- Kanwar KC, Yanamachi R, Lopata A.** Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, v.31, p.321-327, 1979.
- 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. *J Vet Med Sci*, v.65, p.679-684, 2003.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski L.** A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v.49, p.1202-7, 1993.
- Larson BL, Salisbury GW.** The proteins of bovine seminal plasma. 1. Preliminary and electrophoretic studies. *J Biol Chem*, v.206, p.741-749, 1954.
- Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD.** The calmodulin-binding proteins of bovine semen. *J Reprod Fertil*, v.97, p.75-81, 1993a.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L.** Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod*, v.49, p.27-37, 1993b.
- Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A.** Apolipoprotein A-1 binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem*, v.264, p.16853-6857, 1989.
- McEntee M, Isaacs W, Smith C.** Adenocarcinoma of the canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. *Prostate*, v.11, p.163-70, 1987.
- Meyers SA, Yudin AI, Cherr GN, Vande Voort CA, Myles DG, Primakoff P, Overstreet JW.** Hyaluronidase activity of macaque sperm assessed by an in vitro cumulus penetration assay. *Mol Reprod Dev*, v.46, p.392-400, 1997.
- Moreau R, Manjunath P.** Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. *Bioch Biophys Acta*, v.1438, p.175-184, 1999.
- Miller DJ, Winer MA, Ax RL.** Heparin-binding proteins from seminal plasma binds to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*, v.42, p.899-915, 1990.
- Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC.** Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biol Reprod*, v.56, p.771-87, 1997.
- Parrish JJ, First NL.** Fertilization. In: King GJ, Neimann-Sorensen A, Tribe DE (Ed.). *World animal science—Reproduction in domesticated animals*. New York: Elsevier, 1993. p.195-227.
- Pecheur EI, Sainte-Marie J, Bienvenue A, Hoekstra D.** Lipid headgroup spacing and peptide penetration, but not peptide oligomerization, modulate peptide-induced fusion. *Biochemistry*, v.38, p.364-373, 1999.
- Primakoff P, Woodman-Gamer L, Tung KSK, Myles DG.** Reversible contraceptive effect of PH-20 immunization in male guinea pigs. *Biol Reprod*, v.56, p.1142-6, 1997.
- Rodrigues BA, Doná AV, Rodrigues JL.** Influência da secreção prostática autóloga sobre a viabilidade de espermatozoides caninos no pós-descogelamento. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.36, p.316-23, 1999.
- Roncoletta M, Franceschini PH, Lima VFMH, Rodrigues LH, Oliveira MA, Silva C.** SDS-PAGE seminal plasma proteins pattern and its correlation with gir breed semen freezability. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.36, n.2, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000200005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 abril 2007.
- Roncoletta M, Morani ESC, Esper CR, Barnabe VH, Franceschini PH.** Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.77-87, 2006.
- Roncoletta M, Morani ESC, Franceschini PH.** 14 kDa seminal plasma protein identification and its relation with bull semen freezability. *Theriogenology*, v.57, p.479, 2002.
- Sauber K, Foristall K, Ball BA.** Characterization of PH-20 in canine spermatozoa and testis. *Theriogenology*, v.57, p.977-87, 2002.

- Shabanowitz RB, Killian GJ.** Two-dimensional electrophoresis of proteins in principal cells, spermatozoa, and fluid associated with the rat epididymis. *Biol Reprod*, v.36, p.753-68, 1987.
- Souza FF, Barreto CS, Lopes MD.** Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology*, 2007, No prelo.
- Souza FF, Lopes MD.** Massa molar das proteínas do plasma seminal canino: dados preliminares. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.75-77, 2002.
- Souza FF, Martins MIM, Fernandes CES, Ribolla PEM, Lopes MD.** Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology*, v.66, p.1606-1609, 2006.
- Stubbs AJ, Resnick MI.** Protein electrophoresis patterns of canine prostatic fluid – Effect of hormonal manipulation. *Invest Urol*, v.16, p.175-178, 1978.
- Tulsiani DRP, Yoshida-Komiya H, Araki Y.** Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod*, v.57, p.487-94, 1997.
- Varricchio, E., Langella, M., Maharajan, V., Paino, G.** Structure and function of the mammalian epididymis. *Acta Med Vet*, v.42, p.221-34, 1996.
- Wite IG.** Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: Hafez ESE (Ed.). *Reprodução animal*. 4.ed. São Paulo: Manole, 1988. p.212-228.
- Wolf DE, Mckinnon CA, Leyton L, Loveland KL, Saling PM.** Protein dynamics in sperm membranes: implications for sperm function during gamete interaction. *Mol Reprod Dev*, v.33, p.228-34, 1992.
-