



## O estudo proteômico e o seu potencial de avaliação da fertilidade em machos de diferentes espécies domésticas

*The proteomic approach and its potential for fertility assessment in males of different domestic species*

T.B. Barros<sup>1</sup>, D.B. Guimarães<sup>1</sup>, L.R.S. Araújo<sup>1</sup>, L.F. Cantanhêde<sup>1</sup>, A.V. Dias<sup>1</sup>, I.B. Quevedo Filho<sup>1</sup>,  
A.A.A. Moura<sup>2</sup>, R. Tonioli<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen, FAVET/UECE, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia Animal, Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: tonioli@roadnet.com.br

### Resumo

A abordagem proteômica permite identificar componentes proteicos, celulares e secreções. Desta forma, constitui uma ferramenta viável para o estudo das potenciais funções de proteínas e para a busca por marcadores proteicos de fenótipos específicos e/ou processos fisiológicos. Este trabalho teve por objetivo fazer uma revisão sobre esse tema e sua importância na biotecnologia do sêmen de machos domésticos. A composição da membrana espermática e do plasma seminal é de grande interesse, em virtude da sua influência nos eventos de fusão oócito-espermatozoide, fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário. Diversos trabalhos vêm demonstrando o potencial da proteômica ligada à reprodução animal, a qual auxilia na identificação de marcadores de fertilidade ou de ejaculados aptos à congelamento.

**Palavras-chave:** espermatozoide, plasma seminal, proteômica.

### Abstract

*The proteomic approach allows the identification of proteins from tissues, cells and secretion. Thus, this tool is useful for the study of potential protein functions and search for markers of specific phenotypes and/or physiological events. This study aimed to review on the subject and its importance in semen biotechnology of several species. The composition of the sperm membrane and seminal plasma is of great interest because of its influence on sperm-oocyte fusion, fertilization and subsequent embryonic development. Several studies have demonstrated the potential of proteomics related to animal breeding, assisting in identifying markers for fertility or able to ejaculate process of freezing / thawing in males of several species.*

**Keywords:** proteomic, seminal plasm, sperm.

### Introdução

A membrana plasmática é uma barreira entre o citoplasma e o meio extracelular, que contribui para manter a constituição do meio intracelular. Ela é formada por bicamadas lipídicas, que são constituídas principalmente por fosfolípidos, além de uma quantidade variável de moléculas proteicas. São estas as principais moléculas responsáveis pela funcionalidade da membrana e, conseqüentemente, da célula em si (Junqueira e Carneiro, 2000), podendo agir como sensores de sinais externos (ambientais e de outras células), no transporte de moléculas específicas através da célula e participam de reações catalíticas associadas à funcionalidade da membrana, como a síntese de ATP (Alberts et al., 2008).

A proteômica é o estudo dos produtos proteicos expressos pelo genoma. Constitui, assim, uma importante tecnologia, disponível aos pesquisadores da era pós-genômica (Cox e Mann, 2007). Ela identifica e analisa as proteínas presentes em todas as células, constituindo ponto fundamental na avaliação do aspecto estrutural e funcional nos organismos vivos. Cada proteína é especializada para uma determinada função e conhecê-la significa entender determinado processo biológico presente em um indivíduo.

O estudo das proteínas permite identificar as funções de diversos tipos celulares, incluindo os espermatozoides. O estudo proteico do espermatozoide é diferenciado quando comparado ao das células somáticas. Isso ocorre em virtude de a célula espermática ser altamente polarizada e especializada com uma menor quantidade de citosol e de organelas, devido ao fato de o núcleo preencher a maior parte do espaço intracelular (Boerke et al., 2007).

Há ainda proteínas associadas ao plasma seminal. Muitas das proteínas identificadas no fluido das glândulas sexuais anexas (FGA) têm a capacidade para interagir com os espermatozoides da cauda do epidídimo quando a ejaculação ocorre. Isto aumenta a possibilidade de algumas dessas proteínas permanecerem associadas ao espermatozoide, influenciando eventos que ocorrem no trato reprodutivo da fêmea associado com transporte



espermático, capacitação e fertilização (Moura et al., 2007b). Esses mesmos autores, ao realizarem a análise proteômica do FGA de touros maduros da raça Holstein, identificaram proteínas como albumina, nucleobindinas, osteopontina, espermadestina e BSP, expressas em função dos índices de fertilidade dos animais, o que sugere a existência de complexos mecanismos pelos quais a síntese de proteínas do FGA é controlada.

A análise proteômica em espermatozoides permite um maior entendimento sobre as interações das proteínas do plasma seminal com estas células, os espermatozoides, e pode fornecer um modelo de estudo de tais interações (Strzezek et al., 2005). O conhecimento do proteoma dos gametas masculinos também enseja a possibilidade de identificação de marcadores moleculares para avaliação da fertilidade masculina, o que auxilia em diagnósticos clínicos já existentes. Em virtude dessas características, com a presente revisão buscou-se relatar a técnica de proteômica e a sua importância na avaliação da fertilidade de machos domésticos.

### **Importância do estudo das proteínas**

O termo proteômica pode ser definido como a comparação quantitativa dos proteomas para identificar mecanismos celulares envolvidos em processos biológicos. Além disso, tal abordagem permite um estudo de suas estruturas proteicas, localização, modificação, interação, atividade e funções (Carbonaro, 2004).

Esta ferramenta tem-se apresentado de grande importância na biotecnologia da reprodução animal, uma vez que, em diversas espécies com alto valor econômico, técnicas avançadas de proteômica têm sido empregadas para a detecção de marcadores bioquímicos da fertilidade, bem como da congelabilidade do sêmen e da seleção do sexo por meio da separação de espermatozoides e embriões em espécies de interesse zootécnico (Strzezek et al., 2005).

As diferenças de fertilidade observadas entre animais, muitas vezes, não são detectadas pelos testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do sêmen. (Den Daas et al., 1992; Amman, 1995). Análises bioquímicas, associadas aos critérios de avaliação espermática, poderiam auxiliar na identificação de diferenças importantes entre a fertilidade potencial dos animais. Neste sentido, estudos desenvolvidos mostram que há evidência de associações significativas entre a expressão de proteínas seminais e a fertilidade dos machos avaliadas *in vivo* e *in vitro*. Tais proteínas podem ser consideradas como potenciais marcadores moleculares da fertilidade (Killian et al., 1993; Moura et al., 2006). A expectativa de dispor de marcadores que auxiliem a indicação do potencial reprodutivo de um indivíduo tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas, o que poderá contribuir significativamente para a escolha de reprodutores geneticamente superiores.

### **A célula espermática: constituição e modificações para a fertilização**

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas e especializadas e possuem três componentes morfológicos principais: cabeça, peça intermediária e cauda ou flagelo, os quais são cobertos pela membrana plasmática ou plasmalema (Brewis e Gadelha, 2010).

A composição da membrana plasmática do espermatozoide apresenta diferenças entre as espécies animais. Essas diferentes composições estão associadas, por exemplo, a uma maior ou menor sensibilidade a variações de temperatura, que podem ser impostas pela utilização de diversos protocolos de refrigeração e/ou congelamento do sêmen. Embora seja contínua sobre a superfície do espermatozoide, a membrana plasmática desse tipo celular, em mamíferos, apresenta-se organizada em domínios que diferem em composição e função (Wolf et al., 1992), como, por exemplo, a membrana plasmática da cabeça do espermatozoide possui dois domínios maiores: as regiões acrossomal e pós-acrossomal. Há ainda o domínio que compreende a peça intermediária, o que cobre a bainha mitocondrial, e outro na região do flagelo (Eddy e O'Brien, 1994).

A maioria dos domínios de superfície da membrana é estabelecida durante a espermiogênese, entretanto algumas modificações podem ocorrer durante o trânsito no epidídimo, principalmente na peça intermediária e no acrossoma (Magargee et al., 1988).

Existem ainda lacunas sobre detalhes do processo de fertilização do óvulo pelo espermatozoide, mas sabe-se claramente que apenas as células funcionalmente íntegras podem fertilizar e que tal evento envolve, de alguma forma, a superfície da membrana da cabeça espermática (Yanagimachi et al., 1994).

A fertilização inclui eventos como: ligação de proteínas seminais na superfície dos espermatozoides durante a ejaculação; interação de proteínas de membrana dos espermatozoides com células epiteliais do oviduto; capacitação espermática; reconhecimento dos gametas; ligação entre os gametas; reação acrossômica; penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão dos gametas (Jansen et al., 2001).

Apesar de não se saber por completo como esses eventos ocorrem, já foi observada uma série de mudanças complexas que ocorrem na superfície da célula espermática no trato reprodutor feminino. Entre essas modificações, podem-se citar a reorientação e a modificação nas moléculas da superfície espermática, quando o espermatozoide é ativado por fatores capacitantes. Essas mudanças na superfície são requeridas para permitir a ligação entre a célula espermática e a matriz extracelular do oócito (zona pelúcida, ZP). No momento da fertilização, a superfície da cabeça espermática contém complexas proteínas membranares, que reconhecem a ZP



e ligam-se a ela, induzindo também a reação acrossomal. Quando o espermatozoide se dirige ao oolema, outro conjunto de proteínas membranares (região equatorial da célula espermática) participa da adesão e subsequente fusão dos dois gametas durante a fertilização (Gadella, 2008).

Pesquisas envolvendo a tecnologia da proteômica facilitam o entendimento dos eventos moleculares e como tais eventos afetam a função biológica da célula espermática.

### **Proteínas relacionadas ao sêmen**

As proteínas da membrana espermática, bem como aquelas presentes no plasma seminal, apresentam funções importantes nos eventos de reconhecimento e sinalização da fertilização (Cheen et al., 2002).

#### *Proteínas da célula espermática*

Durante o processo de espermiogênese, a célula espermática perde grande parte do citoplasma e das organelas. Em virtude disso, o espermatozoide não possui capacidade de síntese proteica, de modo que sua composição de superfície não pode ser alterada pela inserção de novas proteínas. Desta forma, futuras mudanças na composição da membrana requerem mecanismos alternativos para que isso seja possível (Myles et al., 1990). Tais modificações foram detectadas e mencionadas como constantes, durante os diferentes processos da espermatogênese (Naaby-Hansen et al., 1997); durante os eventos de maturação (Cooper, 1998); ao longo do processo da capacitação espermática (Russell et al., 1984); durante a reação acrossomal no trato reprodutivo feminino e também no processo de fertilização (Wolf et al., 1992). Essas alterações incluem mudanças de localização, expressão proteica, estrutura molecular e mobilidade lateral dos componentes da bicamada (Myles et al., 1990). Segundo Metz et al. (1990), tais alterações podem agir permitindo um aumento da resistência celular a danos citoplasmáticos por choque térmico.

Ao se realizar o perfil eletroforético das proteínas presentes na membrana espermática de touros, após diluição e congelamento do sêmen, foi observado que ocorreu uma diminuição da heterogeneidade proteica após criopreservação seminal, assim como a manutenção ou adição de algumas proteínas membranares, o que demonstrou uma expressiva alteração na composição proteica da membrana espermática frente aos processos de diluição e criopreservação. Essas alterações podem levar a variações dos padrões de fertilidade dos animais (Roncoletta et al., 1999).

#### *Proteínas específicas do plasma seminal*

O plasma seminal é um fluido orgânico que tem como função transportar os espermatozoides até o local onde acontecerá a fertilização. É constituído primordialmente de secreções provenientes das glândulas acessórias e do epidídimo (Moura et al., 2006), e seus constituintes podem atuar modulando a função espermática (Moura et al., 2007b).

Em algumas espécies animais, os constituintes do plasma seminal participam de eventos-chave relacionados à função espermática, à fertilização e ao desenvolvimento embrionário, como já descrito por Chen et al. (2002). Esses autores, ao retirarem as glândulas sexuais acessórias de ratos, observaram uma redução no desenvolvimento embrionário e na taxa de parição, o que sugere uma correlação entre as substâncias produzidas por essas glândulas e os eventos pós-fertilização.

Em 2006, Moura et al. demonstraram a relação existente entre a expressão de determinadas proteínas presentes nas glândulas sexuais acessórias de touros Holstein e a taxa de fertilidade para essa raça. A proteína espermadesina foi maior em touros com baixa fertilidade, enquanto aqueles com alto esc40re de fertilidade apresentavam 2,3 vezes mais teores da proteína osteopontina do que os touros com baixa fertilidade. A expressão da fosfolipase A2 foi similar em reprodutores com alta e média taxa de fertilidade, mas significativamente menor em machos com baixa fertilidade, podendo estas duas últimas atuar como marcadores de fertilidade no reprodutor.

Moura et al. (2007a) fizeram uma análise proteômica do fluido da glândula sexual acessória de touros maduros da raça Holstein e tentaram relacionar os atributos já conhecidos de algumas proteínas com a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Nesse estudo foram identificadas proteínas como albumina, nucleobindinas, osteopontina, espermadesina e BSP (binder of sperm protein). Essas proteínas foram encontradas com graus de variação diferentes. Segundo os autores, esse grau de variação sugere que existe um mecanismo complexo pelo qual a síntese de proteínas do AGF é controlada e que essas proteínas modulam funções espermáticas importantes após a ejaculação e no trato reprodutivo da fêmea. Esses autores determinaram se as proteínas espermadesina, osteopontina, fosfolipase e BSP, encontradas no fluido das glândulas sexuais acessórias, estavam associadas ao potencial de fertilização *in vitro* de espermatozoides provenientes da cauda epididimária em touros Holstein, com graus variáveis de fertilidade. Foi demonstrado que o fluido da glândula sexual acessória de touros de alta fertilidade apresentava grande quantidade de BSP A1/A2 e A3, BSP 30 kDa,



clusterina, albumina, PLA e osteopontina e que sua mistura aos espermatozoides de touro de baixa fertilidade aumentou a capacidade de penetração nos oócitos.

Em suínos, Bianchi et al. (2008) identificaram um polipeptídeo de 26,58 kDa presente no plasma seminal. Segundo esses autores, tal componente está associado à reduzida integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, quando estes são submetidos à congelação e descongelação, o que explicaria a maior sensibilidade espermática dessa espécie para os danos causados pelo frio.

### **A importância da proteômica para a criopreservação seminal**

A criopreservação é uma importante biotécnica para a reprodução animal. Por superar o limite do uso temporal do sêmen, pode ser utilizada para formação de bancos de germoplasma, multiplicação de material genético superior e para auxiliar na reprodução de espécies ameaçadas de extinção. Apesar de seu potencial, o processo de criopreservação reduz a capacidade fertilizante de uma determinada população espermática. Além disso, já foi observada uma variação individual em várias espécies que tiveram o sêmen congelado, como, por exemplo, em suínos (Mies Filho et al., 1978) e touros (Ollero et al., 1998).

Com o objetivo de solucionar a problemática da criopreservação do sêmen de diversas espécies e diminuir os danos que esse processo causa à célula espermática, vários esforços em diversas áreas (que vão desde a criobiologia até a biologia molecular) vêm sendo aplicados e produzindo uma gama de novos conhecimentos, como a busca por novos crioprotetores e marcadores moleculares de fertilidade.

Já foi observado que células e organismos multicelulares respondem a situações estressantes induzindo ou aumentando a síntese de grupos de proteínas, e, no caso de estresse como o choque térmico, essas proteínas foram identificadas como HSPs (Heat shock proteins; Lindquist, 1986). Essa classe de proteínas provê a resistência contra o estresse oxidativo (Fukuda et al., 1996) e a apoptose (Powers et al., 2008), além de mediar a proteção celular durante estresse térmico, entre outras funções (Casas et al., 2010).

Estudos conduzidos por Casas et al. (2010) avaliaram o potencial de uma proteína da classe das HSP, a HSP90AA, como indicador da congelabilidade do sêmen suíno. Nesse caso, os autores observaram uma redução na concentração dessa proteína ao longo do período de criopreservação do sêmen do varrão. Outro aspecto que deve ser destacado é que a concentração dessa proteína foi maior em ejaculados de boa congelação, ou seja, aqueles que apresentavam motilidade superior a 40% após a congelação, nas etapas pós-resfriamento (17°C) e durante adição de glicerol (5°C). No entanto, não foi observada diferença estatística significativa de expressão da HSP90AA entre ejaculados de boa ou má congelação na etapa pós-descongelação. Sugere-se, portanto, que essa proteína pode interferir em ações futuras do ejaculado frente ao choque térmico, bem como mediar a ligação do citosol do espermatozoide com o meio extracelular. A diminuição da expressão da HSP90AA ocorreria em consequência dos danos estruturais que a célula espermática sofre durante a congelação.

Ao compararem o perfil proteico da membrana espermática do sêmen bovino *in natura*, diluído e após congelação, Roncoletta et al. (1999) observaram uma perda da heterogeneidade de proteínas, assim como manutenção ou adição de algumas proteínas membranares, após a descongelação. Tais alterações podem ser responsáveis por grande parte dos danos à célula espermática durante a criopreservação.

Ollero et al. (1998) realizaram trabalho semelhante ao anterior e observaram uma redução de polipeptídeos membranares no sêmen bovino após descongelação. A identificação de proteínas da membrana espermática, envolvidas no processo de fertilização, pode servir como marcador bioquímico e auxiliar no desenvolvimento de testes que avaliem a fertilidade de machos doadores de sêmen em centrais de inseminação artificial. Essa identificação também pode auxiliar na formulação de melhores protocolos para a criopreservação do sêmen.

Em razão do conhecimento prévio de que a adição de plasma seminal proveniente de uma boa congelabilidade de um sêmen com baixa motilidade espermática após a congelação pode aumentar a motilidade progressiva, Barreto et al. (2008) avaliaram os efeitos da adição de um concentrado de proteínas seminais com massa superior a 10 kDa sobre a congelabilidade do sêmen equino. Observou-se nesse estudo que as maiores médias de motilidade total e progressiva foram observadas no tratamento controle, as quais foram superiores às obtidas com adição de 20% de proteínas, mas não diferiram das obtidas com adição de 10% de proteínas do plasma seminal. Tal resultado pode ter sido obtido em virtude de algum tipo de interação que ocorre quando o plasma de diferentes gananhões é misturado, ocasionando a diminuição da motilidade.

### **Considerações finais**

Apesar de já ser conhecida uma grande quantidade de proteínas que atuam sobre a célula espermática, muitas questões ainda precisam ser elucidadas quanto às suas funções fisiológicas, forma e momento de atuação, com a finalidade de se conhecerem os fenômenos que cercam processos como a fertilização.

Além disso, em virtude do seu potencial ligado à reprodução animal, a proteômica pode auxiliar na identificação de marcadores de fertilidade ou de ejaculados aptos ao processo de congelação/dcongelação em



machos de diversas espécies e, dessa forma, tornar essa técnica mais viável para espécies com extrema sensibilidade ao choque térmico, como no caso dos suínos. Tal abordagem evitaria gastos excessivos com a manutenção de reprodutores com sêmen de baixa qualidade para a congelamento, ou com a técnica em si, ao se congelar sêmen que não resultará em adequados resultados de fertilidade em programas de inseminação artificial.

## Referências

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Molecular biology of the cell. 5.ed. New York, NY: Garland Science, 2008. 1600p.
- Amann RP.** Evaluation of sperm quality: can we pick the winners? In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1995, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1995. p.206-212.
- Barreto MAP, Silva JFS, Fagundes B, Caiado JRC, De Souza GV, Shimoya A.** Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. Rev Bras Zootec, v.37, p.2115-2119, 2008. Versão on-line.
- Bianchi I, Collares T, Campos VF, Cavalcanti PV, Kaefer C, Corrêa EK, Dellagostin AO, Lucia Jr T, Deschamps JC, Corrêa MN.** Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozoides suínos pós-descongelamento. Arq Bras Med Vet Zootec, v.60, p.384-388, 2008.
- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM.** A possible role for sperm RNA in early embryo development. Theriogenology, v.68, p.S147-S155, 2007.
- Brewis IA, Gadella BM.** Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. Mol Hum Reprod, v.16, p.68-79, 2010.
- Carbonaro M.** Proteomics: present and future in food quality evaluation. Trends Food Sci Technol, v.15, p.209-216, 2004.
- Casas I, Sancho S, Ballester J, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Rodríguez-Gil JE, Bonet S.** The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. Theriogenology, v.74, p.940-950, 2010.
- Chen H, Cheung MPL, Chow PH, Cheung, ALM, Liu W.** Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. Reproduction, v.124, p.491-499, 2002.
- Cooper TG.** Epididymis. In: Knobil E, Neill JD. Encyclopédia of reproduction. New York: Academic Press, 1998. v.2, p.1-17.
- Cox J, Mann M.** Is proteomics the new genomics? Cell, v.130, p.395-398, 2007.
- Den Daas JHG, Nieland JD, De Jong G.** The relation between number of spermatozoa inseminated per dose of semen and non-return rates for different sires. J Dairy Sci, v.94, p.320-327, 1992
- Eddy EM, O'Brien DA.** The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). The physiology of reproduction. 2ed. New York, NY: Raven Press, 1994. p.29-77.
- Fukuda A, Osawa T, Oda H, Tanaka T, Toyokuni S, Uchida K.** Oxidative stress response in iron-induced acute nephrotoxicity: enhanced expression of heat shock protein 90. Biochem Biophys Res Commun, v.219, p.76-81, 1996.
- Gadella BM.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. Anim Reprod Sci, v.107, p.229-236, 2008.
- Jansen S, Ekhlesi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E.** Sperm adhesion molecules: structure and function. Cells Tissues Organs, v.168 p.82-92, 2001.
- Junqueira LCU, Carneiro J.** Biologia celular e molecular. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 338p.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA.** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. Biol Reprod, v.49, p.1202-1207, 1993.
- Lindquist S.** The heat shock response. Annu Rev Biochem, v.55, p.1151-1191, 1986.
- Magargee SF, Kunze E, Hammersted RH.** Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. Biol Reprod, v.38, p.667-685, 1988.
- Metz KW, Berger T, Clegg ED.** Adsorption of seminal plasma protein by boar spermatozoa. Theriogenology, v.34, p.691-700, 1990.
- Mies Filho A, Hoogstraten MIMJV, Scheid IR.** Congelabilidade do sêmen suíno. Variação individual. Rev Bras Reprod Anim, v.2, p.21-24, 1978.
- Moura AA, Chapman DA, Killian GA.** Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. Mol Reprod Dev, v.74, p.214-222, 2007a.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GA.** A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex



- gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.169-188, 2007b.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GA.** Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl*, v.27, p.201-211, 2006.
- Myles DG, Koppel DE, Primakoff P.** Sperm surface domains and fertilization. In: *Fertilization in mammals* Serono Symposia, Norwell, MA, USA: Serono, 1990. p.169-177.
- 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.771-787, 1997.
- Ollero M, Bescós O, Cebrián-Pérez, JÁ, Muiño-Blanco T.** Loss of plasma membrane proteins of Bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology*, v.49, p.547-555, 1998.
- Powers MV, Clarke PA, Workman P.** Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP0AA1 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*, v.14, p.250-262, 2008.
- Roncoletta M, Morani ESC, Rodrigues LH, Silva C. da, Oliveira MA, Franceschini PH, Ramos PRR.** Comparação do perfil proteico de membrana de espermatozoides do sêmen fresco, diluído e pós-congelamento. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.23-29, 1999.
- Russel LD, Peterson RN, Hunt W, Strack E.** Posttesticular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biol Reprod*, v.30, p.959-978, 1984.
- Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, Fraser L.** Proteomics of boar seminal plasma – current studies possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol*. v.5, p.279-290, 2005.
- 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.228-234, 1992.
- Yanagimachi R, Knobil E, Neill JD.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The physiology of reproduction*. New York, NY: Raven Press, 1994. p.189-317.
-