

# Proteínas do plasma seminal na espécie equina - revisão de literatura

## Luciana de Lima Bezerra

Doutora em Medicina Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - UFV. luluzootec@hotmail.com

## Marcus André Ferreira Sá

Mestre em Medicina Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (PPGMV/IV/UFRRJ), Doutorando em Medicina Veterinária (PPGMV/IV/UFRRJ). marcus.ferreira85@hotmail.com

## Rômulo Zanesco

Médico Veterinário, Prefeitura Municipal de Socorro - SP/ Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI). zanesco\_medvet@yahoo.com.br

## Resumo

A diferenciação, identificação e quantificação de componentes proteicos do plasma seminal que estejam relacionados à estabilização ou proteção da membrana dos espermatozoides são de extrema importância para a criopreservação, visto que, a integridade da mesma é fundamental para o funcionamento adequado do gameta masculino. Diversos estudos enfocam a necessidade de identificação de biomarcadores de congelabilidade, visando assim minimizar os danos causados pelas injúrias provenientes das variações térmicas provocadas pelo congelamento e descongelamento das células espermática. Diante disso, o objetivo da presente revisão foi fornecer informações a respeito das principais proteínas do plasma seminal da espécie equina.

Palavras-chave: Plasma seminal. CRISP. HSP1-2. Espemadesinas.

## Abstract

The differentiation, identification and quantification of protein components of seminal plasma that are related to stabilization or protection sperm membrane are extremely important for cryopreservation, since the integrity of the media is essential for the proper functioning of the male gamete. Several studies focus on the need to identify freezability biomarkers, thus aiming to minimize the damage caused by injuries from the temperature variations caused by freezing and thawing of sperm cells. Thus, the purpose of this review was to provide information about the major protein in the seminal plasma of the equine species.

Keywords: Seminal plasma. CRISP. HSP 1-2. Espemadesinas.

## Introdução

Diversos avanços foram alcançados nos últimos anos no processo de criopreservação do sêmen equino. Porém, a eficiência desta tecnologia varia com a qualidade do sêmen pós-descongelamento, entre os animais e até mesmo entre diferentes colheitas de sêmen do mesmo animal. Esses fatores, em geral, limitam a difusão da criopreservação como rotina na equideocultura.

## Revisão de Literatura

O comportamento do sêmen à criopreservação é muito variável entre reprodutores, com resultados em programas de inseminação artificial variando de 32 a 73% de fertilidade por ciclo. Assim, o sêmen de muitos garanhões não poderia ser utilizado para estes fins (LOOMIS, 2001). Alvarenga *et al.* (1996) demonstraram haver um fator racial relacionado à resistência do sêmen ao processo de criopreservação. Segundo estes autores, as raças Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista apresentaram os piores índices de congelabilidade quando comparadas com raças de hipismo (Hannoveriano, Holstein e Trackenner) e o Quarto-de-Milha, sendo que estes apresentaram sêmen com bons padrões de motilidade pós-descongelamento.

O papel dos constituintes do plasma seminal sobre a congelabilidade ainda não foi totalmente elucidados. Relatos na literatura demonstram resultados contraditórios em relação à adição ou não do plasma seminal de animais para a criopreservação. Esses fatos demonstram de forma evidente a influência da composição do plasma seminal sobre a resistência da célula espermática equina durante o processo de criopreservação.

A concentração de proteínas do plasma seminal equino é relativamente baixa (10 mg/mL) quando comparada a outros mamíferos (20-60 mg/mL). As proteínas do plasma seminal equino (*horse seminal plasma proteins*, HSP), descritas como HSP-1 a HSP-8, apresentam de 14 a 30 kDa e são as principais proteínas até então isoladas e identificadas no plasma seminal de garanhões. Com exceção da HSP-4, todas apresentam propriedades de ligação aos espermatozoides durante a ejaculação e podem ser isoladas nas células espermáticas do ejaculado (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005). Nos anos seguintes, essas proteínas foram subdivididas em três grupos: as proteínas

secretórias ricas em cisteína (CRISPs), proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2) e proteínas da família das Espermadesinas (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

## PROTEÍNAS RICAS EM CISTEÍNA (CRISPS) (PROTEÍNAS SECRETÓRIAS RICAS EM CISTEÍNA)

Os membros da família de proteínas ricas em cisteína (CRISP1, CRISP2, CRISP3) apresentam 16 resíduos de cisteína ligados por ligações dissulfeto, subdividindo a molécula em três domínios (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005). As três proteínas CRISPs foram identificadas nos órgãos genitais de equinos, humanos e roedores, sendo sua expressão gênica controlada por fatores androgênicos (JALKANEN *et al.*, 2005). A ocorrência desse grupo proteico, porém, não se restringe apenas aos órgãos genitais masculinos, podendo este ser encontrado em glândulas salivares, neutrófilos, linfócitos B, timo, cólon e pâncreas (SCHAMBONY *et al.*, 1998b; TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005).

As proteínas CRISPs nos espermatozóides de equinos localizam-se na cabeça, em sua região equatorial e pós-acrossomal, bem como na peça intermediária. Sua associação com a superfície espermática tem início na região do corpo dos epidídimos (SCHAMBONY *et al.*, 1998b) e permanecem localizadas nas mesmas regiões espermáticas após a capacitação *in vitro* e a reação acrossômica (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005). A quantificação das CRISPs através do método Elisa competitivo demonstrou que valores acima de 18.000 moléculas/ célula espermática apresentaram correlação com alta taxa de fertilidade (REINEKE *et al.*, 1999).

O gene da CRISP1 equina (AEG1) é expresso ao longo de todo o epidídimo (GIESE *et al.*, 2002a), enquanto que a CRISP2 (TPX1), proteína específica do testículo, apresenta-se expressa não só no testículo de equinos como também nos epidídimos e nas glândulas seminais de garanhões (GIESE *et al.*, 2002b). Segundo Maeda *et al.* (1999), a CRISP2 (TPX1) está envolvida no desenvolvimento das espermátides, sendo esta proteína uma das responsáveis pela aderência destas células as células de Sertoli, que são células somáticas de grandes dimensões do interior dos testículos, relacionadas com diversas células germinativas no túbulo seminífero.

A CRISP3 (HSP-3, horse seminal protein 3) é a principal proteína do plasma seminal equino (SCHAMBONY *et al.*, 1998a). Sua ocorrência não se restringe apenas aos órgãos masculinos e seu gene é predominantemente expresso nas ampolas dos ductos genitais deferentes (e nas glândulas salivares), contribuindo assim, para a alta concentração desta proteína (1mg/mL) no plasma seminal desta espécie. Quantidades superiores de CRISP3 foram positivamente relacionadas com a taxa de concepção no primeiro ciclo por Novak *et al.* (2010) e poderia ser considerado um bom marcador de fertilidade em equinos. Trein (2011) sugere importante papel da CRISP3 e HSP2 no processo de criopreservação como possíveis marcadores de congelabilidade. Esta proteína apresenta a particularidade de liberação da membrana plasmática (ao menos parcialmente) por meio de lavado das células espermáticas. Por isto, foi proposto que poderia possuir alguma função nos órgãos genitais da fêmea (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005). Para Doty *et al.* (2011) esta proteína está envolvida no mecanismo de limpeza uterina. A presença desta proteína na região pós-acrossomal e na porção média da cabeça dos espermatozoides ejaculados sugere papel importante na fisiologia espermática.

O padrão de expressão do gene da CRISP foi acompanhado pelo estudo da abundância proteica, quando estas proteínas foram detectadas com diferentes massas moleculares (em torno de 25 kDa) nos órgãos genitais dos equinos (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005). Foi sugerido que as proteínas CRISP1 e/ou CRISP2 podem influenciar diretamente os eventos da fertilização (fusão espermatozoides-oócito), e CRISP-3, além de participar dos estágios finais da fusão dos espermatozoides-oócito (identificada na região pós acrossomal e equatorial), pode ter participação na proteção das células espermáticas (SCHAMBONY *et al.*, 1998).

## PROTEÍNAS QUE CONTÊM O DOMÍNIO FIBRONECTINA TIPO II (FN-II) (PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE DOIS OU QUATRO MÓDULOS DE FIBRONECTINA TIPO II (FN-II))

As proteínas da família que contêm o domínio fibronectina tipo II (Fn-II) são caracterizadas pela presença de dois módulos fibronectina tipo II (Fn-II), denominados domínios 'BB'. Essas proteínas são expressas em diferentes regiões dos órgãos genitais

masculinos, sendo expressas no corpo e cauda dos epidídimos (EQ-12) e nas ampolas dos ductos deferentes (SP-1/SP-2) (EKHALASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005a) e identificadas em várias espécies de animais, sendo mais abundantes em bovinos (BSP; MANJUNATH; SAIRAM, 1987), caprino (VILLEMURE *et al.*, 2003), ovino (RSP; BERGERON *et al.*, 2005) e em 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 concentração – pB1 (CALVETE *et al.*, 1997). Mais recentemente, foi identificado um grupo de proteínas fibronectina Fn-II, formadas por quatro módulos, originárias dos epidídimos, que podem estar relacionadas com a maturação espermática. Na espécie equina, esta proteína foi denominada EQ-12 (x). Há uma década, HSP-1 e HSP-2 foram denominadas SP-1 e SP-2 (EKHALASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005a).

A caracterização estrutural da HSP-1 equina demonstrou ser uma proteína que contém o domínio fibronectina tipo II e pertence ao tipo 'AABB', caracterizado por dois módulos (BB) e por dois pequenos domínios "AA". HSP-2 corresponde ao tipo 'ABB', somente com um domínio "A". HSP-1 e HSP-2 são sintetizadas nas ampolas dos ductos deferentes (EKHALASI- HUNDRIESER *et al.*, 2005a). Tanto a EQ-12 como a SP-1 e a SP-2 são associadas à superfície espermática durante o trânsito epididimário e, durante a ejaculação, ambas estão presentes nos espermatozoides presentes no ejaculado. A abundância de SP-1 foi negativamente relacionada à fertilidade em equinos por Novak *et al.* (2010). Jobim *et al.* 2011 e Garcia (2014) associaram a presença de HSP1 em animais de baixa congelabilidade.

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

Durante a ejaculação, as proteínas que contêm o domínio fibronectina tipo II se unem aos espermatozoides mediante interações específicas com os resíduos de colina dos fosfolípidios da membrana plasmática dos espermatozoides, mediando a capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolípidios (MÜLLER *et al.*, 1998; THÉRIEN *et al.*, 1999). Além da ligação aos espermatozoides, estas proteínas unem-se também a glicosaminoglicanos dos órgãos genitais femininos (MANJUNATH *et al.*, 1993a). Estas proteínas apresentam a capacidade de ligação à heparina, um polissacarídeo capaz de

induzir a capacitação quando se liga aos espermatozoides bovinos pelas proteínas (MILLER *et al.*, 1990). Tal efeito é obtido através da modulação da atividade da proteína à qual ela se liga. Glicosaminoglicanos capacitantes semelhantes à heparina são secretados pelos órgãos reprodutivos da fêmea, particularmente na fase folicular (LENZ *et al.*, 1982). Além disso, essas proteínas de ligação à heparina são produzidas pelas glândulas acessórias e cobrem a superfície dos espermatozoides do ejaculado (NASS *et al.*, 1990; MILLER *et al.*, 1990). Recentemente, Kumar e Swamy (2016) demonstraram que a HSP1/2 apresenta atividade semelhante à chaperonas: evitam o estresse oxidativo e protegem as células espermáticas de variações térmicas, além de inibir a peroxidação lipídica, prejudicial ao funcionamento e a motilidade dos espermatozoides.

## PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS ESPERMADÉSINAS

As espermadesinas são glicoproteínas de baixo peso molecular (12-16 kDa), compostas por 110 a 133 resíduos de aminoácidos, constituídas estruturalmente por um único domínio “CUB”, estabilizado por duas ligações dissulfeto conservadas, com resíduos de cisteína ao redor. Esse domínio atua como suporte estrutural, ao qual se pode atribuir diferentes funcionalidades (ROMERO *et al.*, 1997). Em suínos, foram identificados cinco genes estreitamente relacionados que codificam as espermadesinas (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II) (CALVETE *et al.*, 1995b). Em bovinos, apenas dois genes estão presentes para codificar as espermadesinas, aSFP (SPADH1) e Z13 (SPADH2) (TEDESCHI *et al.*, 2000). Em ovinos, uma espermadesina de 15,5 kDa foi descrita (BERGERON *et al.*, 2005) e em equinos, a HSP-7 (REINERT *et al.*, 1996). Embora um membro da família espermadesina (AWN) tenha sido identificado no plasma seminal equino, o gene correspondente ainda é desconhecido na espécie (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005).

Na espécie suína, as espermadesinas correspondem ao principal componente proteico do plasma seminal, representando mais de 90% das proteínas. Produzidas pelas glândulas seminais, são consideradas proteínas multifuncionais que exibem capacidade de ligação à heparina, a inibidores de proteinases, aos fosfolípidos e aos carboidratos (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1998; 1999a,b). As espermadesinas AWN, AQN-1 e AQN-3 do suíno são proteínas de ligação à superfície espermática e parecem estar

envolvidas nos eventos mediados por carboidratos que ocorrem na fertilização (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005a). Curiosamente, AWN é secretada nas caudas dos epidídimos e é igualmente expressa nas tubas uterinas (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002). Segundo Rodrigues-Martinez *et al.* (1998), a proteína AWN permanece aderida à membrana periacrossomal após o transporte pelo órgão genital feminino; na capacitação espermática, e acredita-se que a mesma possa estar envolvida no reconhecimento de gametas.

HSP-7 é a espermedesina equina homóloga à AWN suína. Sua sequência de aminoácidos apresentou modificações de resíduos em apenas três posições (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002). Assim como à AWN suína, é uma proteína de ligação a carboidratos. Mostrou propriedades de ligação à zona pelúcida equina, demonstrando seu papel na interação espermatozoides-zona pelúcida. Em contraste com a AWN suína, a HSP-7 foi primeiramente detectada na espermatogônia, depois na rete testis, nos epidídimos e nas *glândulas* seminais. Também foi isolada de alguns espermatozoides testiculares (HOSHIBA; SINOWATZ, 1998). Durante a passagem pelos epidídimos, acontece um aumento da HSP-7 associadas aos espermatozoides, aparecendo como uma banda proeminente no segmento equatorial (REINERT *et al.*, 1997).

Existem outras proteínas presentes no plasma seminal equino que contribuem para aumentar a variabilidade funcional de proteínas do plasma seminal. A HSP-4 é uma proteína que está relacionada ao produto semelhante ao gene da calcitonina, e concentrações aumentadas de calcitonina no plasma seminal foram relacionados à melhora na motilidade espermática (MUNGAN *et al.*, 2001), à prevenção da capacitação prematura e à reação acrossômica espontânea pelo sistema adenilciclase/AMPC (FRASER *et al.*, 2005).

A HSP-5 apresenta propriedade de ligação à heparina, porém ainda não foi relacionada a nenhuma proteína conhecida. Sua funcionalidade e sequência do N-terminal não foram identificadas em proteínas de outras espécies (TÖPPFER-PETERSEN *et al.*, 2005).

HSP-6 e HSP-8 são diferentes isoformas de uma mesma proteína que pertence à família das calicreínas (TÖPPFER-PETERSEN *et al.*, 2005). Em garanhões, quantidades maiores de calicreína 1E2 (KLK2) foram relacionadas negativamente com a fertilidade (NOVAK *et al.*, 2010). As sequências do N-terminal de ambas isoformas mostraram alto grau de homologia com o antígeno prostático humano (PSA). O

rompimento da arquitetura prostática normal seja pelo câncer, Hiperplasia Prostática Benigna (BPH, do inglês Benign Prostate Hiperplasia) ou dano ligado à glândula (inflamação ou trauma) pode desencadear um aumento nas concentrações séricas de PSA no homem. Desta forma, o PSA atua como biomarcador mais utilizado para o rastreamento de câncer de próstata no mundo, tendo sua dosagem sérica total (tPSA) amplamente solicitada por urologistas para fins de diagnóstico desde sua descoberta na década de 80, devido a sua alta sensibilidade, fácil dosagem, disponibilidade e baixo custo (NA *et al.*, 2013).

Por ser uma serina protease ativa, componente do plasma seminal, sua função é liquefazer o coágulo seminal que se forma na ejaculação liberando os espermatozoides (JONSSON *et al.*, 2005). O sistema enzimático das calicreína-cininas do plasma seminal são capazes de modular a motilidade dos espermatozoides, pelo cininogênio presente no plasma seminal que atua como substrato específico da enzima calicreína (FINK *et al.*, 1989) produzindo as cininas, que são os principais efetores no estímulo da motilidade espermática após a ejaculação (SCHILL *et al.*, 1989). Foram observadas correlações positivas entre a atividade da calicreína no plasma seminal e a motilidade dos espermatozoides no ejaculado (SOMLEV *et al.*, 1996). Um grupo de proteínas que constituem componentes de importância secundária no plasma seminal equino foi descrito. Dentre essas proteínas, encontra-se a lactoferrina, que pode ter origem nos testículos, como foi demonstrado no cão (INAGAKI *et al.*, 2002; KIKUCHI *et al.*, 2003). Há também a leptina e os fatores de crescimento, que podem promover a longevidade dos espermatozoides (CHAMPION *et al.*, 2002), e várias enzimas, tais como lipases (CARVER; BALL, 2002),  $\alpha$  1,4-glicosidases (DIAS *et al.*, 2004) e uma enzima conversora da angiotensina (BALL *et al.*, 2003).

## Considerações Finais

A avaliação e a identificação dos constituintes proteicos do plasma seminal pode ser considerada uma análise diferencial e complementar. Associada aos testes usualmente empregados nas avaliações andrológicas, pode elucidar grande variabilidade

individual na congelabilidade do sêmen na espécie equina e ainda pode ser utilizada como biomarcadores de fertilidade.

## Referências

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. The effect of breed and spermatoc parameters over equine semen freezability. In: Symposium on Stallion Semen, 1996, Amersfoort. **Proceedings...** Amesterfoort, SSS, p. 82. (Abstract), 1996.

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

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

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

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; RAIDA, M.; SANZ, L.; TÖPFERPETERSEN, 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**, v. 365, p. 179-182, 1995b.

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

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

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**, v. 57, p. 1793–1800, 2002.

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**, v. 61, p.1545–1558, 2004.

DOTY, A.; BUHI, W. C.; BENSON, S.; SCOGGIN, K. E.; POZOR, M.; MACPHERSON, M., MUTZ, M.; TROEDSSON, M. H. T. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 157-164, 2011.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; GOHR, K.; WAGNER, A.; TSOLOVA, M.; PETRUNKINA, A.; TÖPFER-PETERSEN, E. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in pig. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p. 536-45, 2005b.

EKHALASI-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 Development**, v.70, p. 45–57, 2005a.

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

FINK, E.; SCHILL, W.B.; MISKA, W. Kinin-containing kininogen is present in human seminal plasma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 247, p. 311-315, 1989.

FRASER, L. R.; ADEOYA-OSIGUWA, S.; BAXENDALE, R. W.; MEDEDOVIC, S.; OSIGUWA, O. O. First messenger regulation of mammalian

sperm functions via adenylyl cyclase/cAMP. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p.37-46, 2005.

GARCIA, Luiza Almeida Deragon. **HSP-1 e HSP-2 no plasma seminal equino: efeitos da sazonalidade na concentração e relação com a fertilidade de garanhões**. 2014. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

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

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

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

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

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

JOBIM, M. I. M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R. M.; SIEME, H.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, 765-771, 2011.

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

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-56, 2008.

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 Medical Science**, v. 65, p. 679-684, 2003.

KUMAR, C. S.; SWAMY, J. M. HSP-1/2, a major horse seminal plasma protein, acts as a chaperone against oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, p. 1058-1063, 2016.

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

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

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

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

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acid proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemistry Journal**, v. 3, p. 685-92, 1987.

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

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

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

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

NA, R.; WU, Y.; XU, J.; JIANG, H.; DING, Q. Age-specific prostate specific antigen cutoffs for guiding biopsy decision in chinese population. **Plos One**, v. 8(6), p. 1-9, 2013

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

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

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

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

REINEKE, A.; HESS, O.; SCHAMBONY, A.; PETRUNKINA, A. M.; BADER, H.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E. Sperm-associated seminal plasma

Proteins - a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions?  
**Pferdeheilkunde**, v. 6, p. 531-537, 1999.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; IBORRA, A.; MARTINEZ, P.; CALVETE, J.J.  
Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar  
spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. **Reproduction Fertility Development**,  
v.10, p. 491-497, 1998.

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

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**, v. 58; p. 88-100, 2001.

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

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

SCHILL, W.; B. Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. In: Fritz H,  
Schmidt I, Dietze G (Ed.). *The kallikrein-kinin system in health and disease*. Hamburg:  
Limbach Verlag, 1989, p.171-203

SOMLEV, B.; HELILI. K.; KARCHEVA, V. Tissue kallikrein activity in seminal  
plasma of bovine ejaculates with different quality. **Theriogenology**, v. 45, p. 471-475,  
1996.

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

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

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

TÖPFER-PETERSEN, E. Molecules on the sperm's route to fertilization. **Journal of Experimental Zoology**, v. 285, p. 259-266, 1999b.

TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. **Human Reproduction**, v. 5, p. 314-329, 1999a.

TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.F.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; DOSTALOVA, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v. 30, p. 217-224, 1998.

TREIN, Cristina Rodrigues. **Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida do plasma seminal equino e a sua relação com a congelabilidade do sêmen**. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Medicina Animal) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

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