



## Proteínas do plasma seminal canino: revisão

*Protein patterns of canine seminal plasma: review*

L.T. Brito-Nery<sup>1,3</sup>, M.F. van Tilburg<sup>2</sup>, E.B. Menezes<sup>2</sup>, V.P. Machado<sup>2</sup>, A.A.A. Moura<sup>2</sup>, E.C.S. Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: lorenatavares@gmail.com

### Resumo

Nas últimas décadas, o crescente interesse pela cinofilia motivou o crescimento de uma atividade comercial lucrativa. Assim, há um interesse em aumentar a *performance* reprodutiva por meio de biotécnicas da reprodução, como a criopreservação de gametas e a inseminação artificial. A identificação de proteínas presentes no plasma seminal canino dá início a novas discussões sobre o uso de proteínas em aditivos que melhorem a viabilidade espermática e possam ser usados como método contraceptivo em cadelas. Dessa forma, este trabalho objetivou descrever as proteínas do plasma seminal canino verificadas na literatura científica, como a lactoferrina, a arginina esterase, as proteínas ligadoras de heparina, a osteopontina e as proteínas ligadoras de zinco, assim como relacioná-las com suas respectivas funções diante da esfera reprodutiva.

**Palavras-chave:** arginina esterase, lactoferrina, osteopontina, proteínas de ligação à heparina, proteínas de ligação ao zinco.

### Abstract

*In the past few years, the interesting in dogs has provided an increase of this commercial activity. Thus, there is an interest in the increase of reproductive performance using biotechnology such as semen cryopreservation and artificial insemination. The identification of proteins present in seminal plasma canine amazed initiates further discussion on the use of protein additives that improve sperm viability and it can be used as contraception in female dogs. Thus, this study aimed to describe the canine seminal plasma proteins, described in the scientific literature, such as lactoferrin, arginine esterase, the heparin-binding proteins, osteopontin and zinc binding proteins, as well as relate them to their respective functions on the reproductive sphere.*

**Keywords:** arginine esterase, heparin-binding proteins, lactoferrin, osteopontin, zinc-binding proteins.

### Introdução

O plasma seminal de mamíferos é uma secreção formada pelos fluidos das glândulas sexuais acessórias, epidídimos e testículos, e sua composição é capaz de afetar a função espermática desde a maturação até a fertilização do oócito no trato reprodutor feminino (Yanagimachi, 1994; Kraus et al., 2005; Marques Filho, 2006; Foxcroft et al., 2008; Moura et al., 2011). No cão, o plasma seminal é um produto das secreções dos ductos ejaculatórios, que é o próprio ducto deferente, o qual tem sua origem na cauda do epidídimo e desemboca nos colículos seminais e na uretra, bem como da próstata (Johnston et al., 2001; Souza, 2007) em resposta à testosterona (Wite, 1988; Parrish e First, 1993). O ejaculado canino apresenta três frações distintas. A primeira fração, pré-espermática, é secretada em pequeno volume, com poucos ou nenhum espermatozoide, e originada sobretudo de secreções da próstata. A segunda fração, rica em espermatozoides, é principalmente de origem epididimária e contém pouco fluido prostático. Já a terceira fração, pós-espermática, contribui com maior volume do plasma seminal durante a ejaculação e também é predominantemente de origem prostática (England et al., 1990; Rota et al., 2007; Yamashiro et al., 2009).

Acredita-se que as proteínas presentes no fluido seminal, provenientes do próprio plasma seminal, causam efeitos benéficos sobre os parâmetros de motilidade espermática e na prevenção da formação dos peróxidos lipídicos danosos à membrana espermática (Ochsendorf, 1999; Mogielnicka-Brzozowska et al., 2012). Dessa forma, esta revisão objetivou descrever as proteínas presentes no plasma seminal canino e suas respectivas funções.

### Proteínas do plasma seminal

Entre as espécies domésticas, a concentração de proteínas do plasma seminal varia entre 3 e 7% (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). Os valores médios variam entre 1,44 g/dl, 4,25 g/dl e 3,07g/dl na primeira, segunda e terceira frações do ejaculado, respectivamente (England et al., 1990). Um estudo usando eletroforese



unidimensional identificou 37 bandas com massas moleculares variando entre 100,6 kDa e 3,6 kDa, e, dentre essas, cerca de 85% das bandas apresentaram massas moleculares abaixo de 17 kDa (Souza et al., 2007).

No plasma seminal canino, já foram identificadas a arginina esterase (Chapdelaine et al., 1984), a lactoferrina (Kikuchi et al., 2003), as proteínas de ligação à heparina (Souza et al., 2006), a osteopontina (Souza et al., 2009) e as proteínas ligadoras de zinco (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2012).

#### *Lactoferrina*

A lactoferrina é uma glicoproteína, pertencente à família das transferrinas de peso molecular de aproximadamente 80 kDa e com alta afinidade ao íon férrico -  $Fe^{2+}$  (Metz-Boutique et al., 1984; Adlerova e Bartoskova, 2008). Essa proteína já foi encontrada no fluido uterino, na secreção vaginal, bem como na saliva, na bile, no suco pancreático e nas secreções intestinais, nasais e lacrimais (Masson et al., 1966; Baker, 1994; Levay e Viljoen, 1995; Lonnerdal e Iyer, 1995; Kikuchi et al., 2003; Baker e Baker, 2005; Adlerova e Bartoskova, 2008).

A lactoferrina atua como antimicrobiano e regula a expressão gênica (Furmanski, 1995; Nozaki et al., 2002), por meio de interações com ácidos nucleicos que ativam a transcrição de células do tipo natural killer, (Dacheux et al., 2005) no trato reprodutor masculino, e sua ação ainda está associada com o aumento da fertilidade e da qualidade seminal (Kuo et al., 2000), pois trata-se de um quelante metálico atuando como sequestrador dos íons férricos (Nozaki et al., 2003).

Embora a expressão e a função da lactoferrina em cães ainda não tenham sido totalmente elucidadas, Kikuchi (2003) correlacionou positivamente sua presença com a concentração espermática e a considerou como um marcador da função gonadal.

#### *Arginina esterase*

A CPSE (*Canine Prostatic Specific Arginine Esterase*) possui ação enzimática e está presente em altas concentrações no fluido prostático do cão (aproximadamente 10 ng/ml; McEntee et al., 1987). É produzida pelas células epiteliais secretoras da próstata sob influência da testosterona (Klausner et al., 1994). Em cães portadores da hiperplasia prostática benigna, seus níveis séricos apresentam-se elevados, atuando como um marcador biológico da próstata (Klausner et al., 1994). Além disso, ainda apresenta grande semelhança com o antígeno prostático específico (PSA) humano (Dubé et al., 1986).

Frenette et al. (1985) sugeriram que a CPSE atuaria na cauda do espermatozoide, e Dubé (1994) sugeriu que a finalidade seria a catalização de proteínas presentes na superfície espermática ou o transporte como proteína “ligada” para atuar em sítios distantes. A massa molecular média da CPSE presente no plasma seminal é de 29,5 kDa, quando determinada por filtração em gel (Sephadex G-100), e de 25 kDa quando determinada pela eletroforese SDS-PAGE sob condições não desnaturantes (Chapdelaine et al., 1984). Estruturalmente é formada por duas subunidades, H e L, com pesos moleculares variando de 15 kDa e 12 a 14 kDa, respectivamente (Isaacs e Shaper, 1985).

Souza et al. (2007) identificaram altas concentrações de uma banda com massa molecular de 15,6 kDa. Os autores sugeriram tratar-se de uma subunidade da CPSE.

#### *Proteínas de Ligação à Heparina (HBPs)*

O plasma seminal de cães contém cerca de 19 a 23 proteínas ligadoras de heparina (Souza et al., 2006, 2007). O espermatozoide possui a capacidade de ligar-se à heparina e às moléculas semelhantes, como as glicosaminoglicanas (GAGs) da tuba uterina. Essa ligação tem sido associada à presença de proteínas do plasma seminal ligadas à superfície espermática, o que leva à modulação do acrossomo induzida pelas glicosaminoglicanas da zona pelúcida (Miller et al., 1990).

A capacitação espermática ocorre no trato reprodutivo feminino, que contém fluidos com altas concentrações de glicosaminoglicanas (Lee e Ax, 1984; Lee et al., 1986), sendo estas secretadas, principalmente na fase folicular (Lenz et al., 1983). A heparina é uma glicosaminoglicana, e estudos revelam que ela se correlaciona positivamente na indução de espermatozoides capacitados em touros (Assumpção et al., 2002).

As proteínas de ligação à heparina (HBPs) são responsáveis por modular eventos de ligação da heparina à membrana espermática, servindo como marcadores moleculares da fertilização (Folhadella, 2008). São produzidas pelas glândulas sexuais acessórias (próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais) dos machos e secretadas no fluido seminal (Nass et al., 1990). São identificadas em várias espécies, como bovinos (Chandonnet et al., 1990), equinos (Frazer e Bucci, 1996; Reinert et al., 1997), suínos (Calvete et al., 1996), búfalos (Hiron et al., 2006) e cães (Souza et al., 2006).

Souza et al. (2007) detectaram a presença de 37 bandas de proteínas em plasma seminal canino, sendo duas correlacionadas positivamente com os parâmetros seminais (motilidade espermática, vigor, porcentagem de espermatozoides normais e integridade de membrana). Além disso, nove bandas teriam a capacidade de se ligar à



heparina e estariam envolvidas com a reação acrossomal (Souza et al., 2006).

### *Osteopontina*

A osteopontina (OPN) do plasma seminal bovino é uma glicoproteína de massa molecular de 55 kDa e pI 4,5 (Killian et al., 1997). Foi identificada e isolada da matriz óssea bovina, das cartilagens, do útero, dos ovários, da pele fetal, dos rins, do cérebro, da urina, da bile, do leite bovino (Kerr et al., 1991; Sorensen e Petersen, 1993; Eloy e Furtado, 2008) e do plasma seminal (Franzen e Heinegard, 1985; Eloy e Furtado, 2008).

Estruturalmente, a OPN possui uma sequência de aminoácidos denominada RGD (arginina, glicina, aspartato) conservada, que possui capacidade de ligar-se às integrinas (Butler, 1995; Gonçalves et al., 2007; Moura et al., 2011), e espermatozoides (Gonçalves et al., 2007; Moura et al., 2011). A OPN participa, desta forma, de processos relacionados à fertilização em bovinos (Moura, 2005; Moura et al., 2011). A OPN tem origem no fluido das glândulas sexuais acessórias e, durante a ejaculação, liga-se à membrana espermática por meio das integrinas, constituindo o complexo OPN-integrinas, e interage com receptores da membrana oocitária (D’Cruz, 1996; Moura et al., 2011). Além disso, segundo Moura et al. (2011), a OPN parece desencadear a cascata de sinalização intracelular, o que favorece o desenvolvimento embrionário, explicando, parcialmente, a sua associação aos índices de fertilidade de reprodutores de diversas espécies (Moura et al., 2011).

Em cães, estudos sobre a expressão e a função da OPN são escassos. Souza et al. (2009) observaram interações de bandas com o anticorpo antiosteopontina, sendo duas bandas proteicas (77,2 kDa e 15,6 kDa) marcadas no *western blot* quando submetidas à eletroforese unidimensional. Na membrana espermática, foram marcadas 12 bandas (70,6 kDa a 26,6 kDa), sendo três marcadas fortemente (46,4 kDa, 37,7 kDa e 36,5 kDa).

### *Proteínas de ligação ao zinco (ZnBps)*

O zinco está envolvido tanto na espermatogênese quanto na função espermática (Henkel et al., 2003). Estima-se que apenas 7% do zinco está situado na cabeça do espermatozoide, o que contribui para a estabilidade da estrutura quaternária de sua cromatina nuclear, e que cerca 93% do zinco encontra-se no flagelo dos espermatozoides ejaculados (Henkel et al., 1999), sendo diretamente relacionado ao entrelaçamento e à distensão das fibras que compõem a cauda espermática (Smith e Akinbami, 2000).

Como a maior parte das secreções de plasma seminal canino é derivada da glândula prostática (Dube et al., 1985; Nothling e Volkmann, 1993), estima-se que a maior parte das proteínas que possuem a capacidade de se ligar ao zinco sejam originadas da próstata (Strzeżek et al., 1987; Hołody e Strzeżek, 1999; Mogielnicka-Brzozowska et al., 2012).

As proteínas transportadoras de zinco no plasma seminal (ZnBPs) são proteínas que possuem a capacidade de se ligar ao zinco para atuarem em sítios distantes. São originadas em diferentes glândulas acessórias sexuais e são pontos-chave para eventos associados ao processo de fertilização, pois exercem influência na membrana plasmática dos espermatozoides (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2012).

Ainda são escassos na literatura trabalhos que relacionem a função do zinco no plasma seminal canino. Estudos sobre as ZnBPs em SDS-PAGE revelaram 13 bandas proteicas, com massas moleculares variando de 11,6 a 152,3 kDa. Além disso, foram detectadas duas frações proteicas com massa molecular de 11,6 a 14,3 kDa, compondo aproximadamente 28 a 30% do total de proteínas presente nas amostras analisadas. Os autores ainda citam que estes resultados são significativos quanto à capacidade do zinco em se ligar às proteínas secretadas pela próstata canina e que poderiam exercer influências no processo reprodutivo em cães (Mogielnicka-Brzozowska, 2012). Isso porque o íon zinco causa, no momento da ejaculação, uma estabilização temporária das proteínas nucleares espermáticas pela ligação com radicais sulfidrilas presentes nas proteínas nucleares (Yanagimachi, 1994).

### **Considerações finais**

Ainda são escassos estudos que enfatizem as funções biológicas das proteínas presentes no plasma seminal de cães. Com isso, a revisão acima contribui para um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos da reprodução de canídeos domésticos e silvestres. No entanto, ela também demonstra a necessidade de novas pesquisas no âmbito da proteômica do plasma seminal canino com a finalidade de buscar novas técnicas que possibilitem uma eficácia reprodutiva, como o uso de aditivos proteicos em nutracêuticos e métodos contraceptivos (vacinas imunológicas e esterilização química).

### **Referências**

- Adlerova L, Bartoskova A. Lactoferrin: a review. *Vet Med*, v. 53, p.457-468, 2008.  
Assumpção MEOD, Haipeck K, LIMA AS, Mello MRB, Oliveira LJ, Oliveira VP, Tavares LMT, Visintin JA. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em



- touros. *Braz J Vet Res Anim Sci*. v.39, p.149-156, 2002.
- Baker EN.** Structure and reactivity of transferrins. *Adv Inorganic Chem*, v.41, p.389-463, 1994.
- Baker EN, Baker HM.** Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* v.62, p.2531-2539, 2005.
- Butler WT.** Structural and functional domains of osteopontin. *Ann NY Acad Sci*, v.760, p.6-11, 1995.
- Calvete JJ, Carrera E, Sanz L, Töpfer-Petersen E.** Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Biol Chem*, v.377, p.521-527, 1996.
- 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.
- Dacheux J, Castella S, Gatti JL, Dacheux F.** Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v.63, p.319-341, 2005.
- Dubé JY.** Prostatic kallikreins: biochemistry and physiology. *Comp Biochem Physiol*, v.107, p.13-20, 1994.
- Dube JY, Frenette G, Chapdelaine P, Paquin R, Tremblay RR.** Biochemical characteristics of the proteins secreted by dog prostate, a review. *Experimental Biology* v. 43, p. 149-159, 1985.
- 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.
- Eloy ÂMX, Furtado JR.** Marcadores de congelabilidade no plasma seminal de caprinos - estudos preliminares. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br>. Acesso em: jan. 2013.
- England GCW, Allen WA, Middleton DJ.** An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res Vet Sci*, v.49, p.66-70, 1990.
- Marques Filho WC.** Espermatogênese em bovinos. 2006. 25f. Monografia - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2006.
- Folhadella IM.** Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir. 2008. 66f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.
- Foxcroft GR, Dyck MK, Ruiz-Sanchez A, Novak S, Dixon WT.** Identifying useable semen. *Theriogenology*, v.70, p.1324-1336, 2008.
- Franzen A, Heinegard, D.** Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. *Biochem J*, v.232, p.715-724, 1985.
- Frazer GS, Bucci DM.** Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, v.46, p.1389-402, 1996
- 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, 1985.
- Furmanski PHJ.** Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, v.23, p.721-724, 1995.
- Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ.** Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins ( $\alpha$ v and  $\alpha$ 5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, v.67, p.468-474, 2007.
- Henkel R, Bittner J, Weber R, Huther F, Miska W.** Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil Steril*, v.71, p.1138-1143, 1999.
- Henkel R, Baldauf C, Schill WB.** Resorption of the element zinc from spermatozoa by the epididymal epithelium. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.97-101, 2003.
- Hiron M, Harshan LP, Singh A, Arangasamy MR.** Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.93, p.124-133, 2006.
- Holody D, Strzeżek J.** Heparin- and Zn<sup>2+</sup>-binding proteins from boar seminal plasma. *Acta Biochim Pol*, v.46, p.935-939, 1999.
- Isaacs JT, Isaacs WB, 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
- Kilian A, Bowtell DDL, Abud HE.** Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex slicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet*, v.6, p.2011-2019, 1997.
- Johnston SD, Root K, Olson PNS.** Breeding management and artificial insemination of the bitch. In: *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2001. p.41-65,
- Kerr JM, Fisher LW, Termine JD.** The cDNA clonig and distribution of bovine osteopontin. *Gene*, v.108, p.237-243, 1991.
- 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.

**Klausner JS, Bell FW, Hayden DW, Johnston SD, Lund EM.** Recent developments in the diagnosis and treatment of BPH and prostatic carcinoma. In: Proceedings. American College of Veterinary Internal Medicine. Lakewood, CO: ACVIM, 1994. p.547-548.

**Kraus M, Tichá M, Zelezná B.** Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *J Reprod Immunol*, v.65, p.33-46, 2005.

**Kuo YH, Cheng WTK, Tu CF, Wu SC, Chen HT, Hsieh SH.** Motility and fertility of frozen semen from normal and transgenic boars with or without transgene. *Asian-Aust J Anim Sci*, v.13, suppl. A, p.74, 2000.

**Lee CN, Ax RL.** Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci*, v.67, p.2006-2009, 1984.

**Lee CN, Bushmeyer CSM, First NL, Ax AL.** Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *J Anim Sci*, v.63, p.861-867, 1986.

**Lenz RW, Ball GD, Loohe JK, First NL, Ax RL.** Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.28, p.683-685, 1983.

**Levy PF, Viljoen M.** Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, v.80, p.252-267, 1995.

**Lonnerdal B, Iyer S.** Lactoferrin: molecular structure and biological function *Annu Rev Nutr*, v.15, p.93-110, 1995.

**Masson PL, Heremans JF, Dive C.** An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin Chim Acta*, v.14, p.735-739, 1966.

**McEntee M, Isaacs W, Smith C.** Adenocarcinoma of canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. *Prostate*, v.11, p.163-170, 1987.

**Metz-Boutique MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P.** Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem*, v.145, p.659-676, 1984.

**Miller DJ, Winer MA, Ax RL.** Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*, v.42, p.899-915, 1990.

**Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W.** Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. *Pol J Vet Sci*, v.15, p.493-498, 2012.

**Moura AA.** Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. *Anim Reprod*, v.2, p.3-10, 2005.

**Moura AA, Andrade CR, Souza CEA, Rêgo JPA, Martins JAM, Oliveira RV, Menezes EBS.** Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.139-144, 2011.

**Nass SJ, Miller DJ, Winer MA, Ax RL.** Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to caudal epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol Reprod Dev*, v.25, p.237-246, 1990.

**Nozaki A, Ikeda M, Naganuma A, Nakamura T, Inudoh M, Tanaka K, Kato N.** Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J Biol Chem*, v.278, p.10162-10173, 2003.

**Nozaki A, Tanaka K, Naganuma A, Kato N.** Recent advances of basic research and clinical application of lactoferrin as an antiviral reagent against chronic hepatitis C [article in Japanese]. *Nippon Rinsho*, v.60, p.819-829, 2002.

**Nothling JO, Volkmann DH.** Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J Reprod Fertil*, v.47, p.329-333, 1993.

**Ochsendorf FR.** Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, v.5, p.399-420, 1999.

**Parrish JJ, First NL.** Fertilization. In: King GJ, Neimann-Sorensen A, Tribe DE. *World animal science: Reproduction in domesticated animals*. New York: Elsevier, 1993. p.195-227.

**Pilch B, Mann M.** Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol*, v.7, p.1-10, 2006.

**Reinert M, Calvete J, Sanz L, Topfer-Petersen E.** Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, an topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. *Andrologia*, v.29, p.179-186, 1997.

**Rota A, Milani C, Romagnoli S.** Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. *Theriogenology*, v.67, p.520-525, 2007.

**Smith OB, Akinbamijo OF.** Micronutrients and reproduction in farm animals. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.549-560, 2000

**Sorensen ES, Petersen TE.** Purification and characterization of three proteins isolated from the protease peptone fraction of bovine milk. *J Dairy Res*, v.60, p.198-197, 1993.

**Souza FF.** Proteínas do sêmen do cão são importantes ou não na fertilização? *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.108-114, 2007.

**Souza FF, Barreto CS, Lopes MD.** Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine



semen analysis. *Theriogenology*, v.68, p.100-106, 2007.

**Souza FF, Chirinéa VH, Martins MIM, Lopes MD.** Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod Domest Anim*, v. 44, p.283-286, 2009.

**Souza FF, Martins MI, Fernandes SCE, Ribolla PE, Lopes MD.** Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology*, v.66, p.1606-1609, 2006.

**Strzeżek J, Hopfer E, Zaborniak A.** Zinc ion dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Anim Reprod Sci*, v.13, p.133-142, 1987.

**Yamashiro H, Narita K, Sugimura S, Sugawara A, Hoshino Y, Sakurai M, Yokoo M, Konno T, Yoshida M, Sato E.** Influence of the prostatic fluid from the first and third fractions of the ejaculates on the cryosurvival of poodle dog sperm. *Am J Anim Vet Sci*, v.4, p.14-20, 2009.

**Wite RG.** Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. *In: Hafez ESE. Reprodução animal. 4.ed. São Paulo: Manole, 1988. p.212-228.*

**Yanagimachi R.** Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, v.2, p.371-372, 1994.

---