

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 19/05/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

PERFIL PROTEICO DO SÊMEN DE CÃES: EM BUSCA DE UM
ANTÍGENO ESPERMÁTICO PARA CONTRACEPÇÃO

Otávio Luís de Oliveira Henriques Paulo

Botucatu/SP
Dezembro/2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

PERFIL PROTEICO DO SÊMEN DE CÃES: EM BUSCA DE UM
ANTÍGENO ESPERMÁTICO PARA CONTRACEPÇÃO

Otávio Luís de Oliveira Henriques Paulo

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia Animal, área de
Reprodução Animal

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana
Ferreira de Souza

Botucatu/SP
Agosto/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Paulo, Otávio Luís de Oliveira Henriques.

Perfil proteico do sêmen de cães : em busca de um
antígeno espermático para contraceção / Otávio Luís de
Oliveira Henriques Paulo. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza
Capes: 50504002

1. Cães. 2. Vacina veterinária. 3. Sêmen. 4. Epidídimo.
5. Proteômica.

Palavras-chave: Canino; Epidídimo; Plasma seminal;
Proteômica; Viabilidade espermática.

Nome do autor: Otávio Luís de Oliveira Henriques Paulo

Título: PERFIL PROTEICO DO SÊMEN DE CÃES: EM BUSCA DE UM
ANTÍGENO ESPERMÁTICO PARA CONTRACEPÇÃO

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP -
Botucatu/SP.

Profa. Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP -
Botucatu/SP.

Dra. Caroline Scott

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP -
Botucatu/SP.

Prof. Dra. Maricy Apparício Ferreira

Membro

Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução
Animal – UNESP – Jaboticabal/SP.

Dra. Michele Silva Araujo

Membro

Departamento de Pós Graduação da faculdade UNILEYA - EAD.

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro Suplente

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP -
Botucatu/SP.

Dra. Beatrice Ingrid Macente

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Brasil – Florianópolis/ SC.

Dra. Cristiane Sella Paranzini

Membro Suplente

Departamento: Interna em Medicina de Animais de Laboratório - Primatas não Humanos -

Unidade: The Mannheimer Foundation Inc – Flórida/ EUA.

Data da Defesa: 19 de maio de 2020.

DEDICO esta tese aos meus pais e namorada pelo apoio e auxílio em todos os momentos, e a meu filho, Lucas Gabriel que me ensina, diariamente, a importância da persistência.

Agradecimentos

A Olorum, Deus Pai, Criador de tudo e de todos, por me conceder a oportunidade de crescer como homem e espírito. Sua benção, hoje e sempre.

Aos Sagrados Pais e Mães Orixás, por me darem a sabedoria, força e coragem necessárias para seguir em frente. Que Sua Luz me ilumine hoje e sempre, pois onde há Luz, as trevas não imperam.

Aos Guias, Mentores, Protetores, Mensageiros e Guardiães pelo apoio, palavras e assistência nos momentos difíceis. Meus respeitos, hoje e sempre.

Aos meus pais, Ivone e Laurentino, pelo apoio irrestrito, e por nunca terem deixado de acreditar em mim.

A minha irmã, Alessandra, pelo carinho, amizade e por ter me estimulado a buscar o título de doutor.

Ao meu cunhado Welinton, por nunca ter sido um cunhado para mim, mas um irmão.

Aos meus sobrinhos e afilhados, obrigado por fazerem parte da minha vida.

A minha namorada, Taís, pela compreensão, carinho e parceria durante este período. Sem você, não teria sido possível completar mais esta etapa dos meus estudos.

Ao meu filho, Lucas, pelo amor, compreensão, sorrisos e abraços. Por cada palavra sua e por cada passo seu. Obrigado por existir. Ser seu pai é a maior alegria que Deus me deu.

A minha orientadora, professora Fabiana Ferreira de Souza, pela paciência, ensinamentos, conselhos e sobretudo por ter acreditado em mim.

Aos professores do departamento de reprodução animal que me acolheram na UNESP com carinho e respeito.

À toda a equipe do departamento de reprodução animal e radiologia veterinária da UNESP/ Botucatu pela ajuda e parceria.

Aos residentes da Reprodução Animal da UNESP/ Botucatu, pelo respeito e carinho com que sempre me trataram.

Aos colegas mestrandos e doutorandos, meus agradecimentos pelo apoio e amizade. Em especial agradeço a Carol Scott, Michele Araújo e Cristiane Sella Paranzini com quem tive o prazer de conviver por um período maior.

A todos os colaboradores que auxiliaram para que este trabalho pudesse ser concretizado.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 – cujo apoio viabilizou a realização do presente trabalho.

Aos graduandos do curso de Medicina Veterinária, pela amizade e carinho ao me receber na sala de aula durante o estágio docência.

A todos os cães que participaram deste estudo e também aos que não participaram, mas dividiram comigo sua alegria.

...meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1.....	1
1 – Introdução e justificativa.....	2
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Espermatogênese.....	4
2.2. Composição do espermatozoide e fisiologia do movimento	7
2.3. Maturação espermática	12
2.4 Ejaculação.....	12
2.5. Reação do acrossomo e fertilização	14
2.6. Proteômica dos espermatozoides e fluídos	14
2.6.1. Proteínas do plasma seminal.....	14
2.6.2. Proteínas do fluido epididimário.....	19
2.6.3. Proteínas da célula espermática.....	20
2.6.4. Vacinas contraceptivas	21
Referências.....	25
CAPÍTULO 2.....	33
Investigação das proteínas do plasma seminal, fluido epididimário e células espermáticas de cães: a busca de uma proteína contraceptiva	38
RESUMO	39
1. Introduction.....	40
2. Material e methods.....	41
2.1. Reagents.....	Erro! Indicador não definido.
2.2. Ethical aspects.....	Erro! Indicador não definido.
2.3. Animals and experimental design	Erro! Indicador não definido.
2.4. Semen collection.....	Erro! Indicador não definido.
2.5. Semen Anayisis	Erro! Indicador não definido.
2.6. Sample preparation and mass spectrometry	Erro! Indicador não definido.
2.7. Statistics.....	Erro! Indicador não definido.
3. Results.....	Erro! Indicador não definido.
3.1. Analysis of sperm quality	Erro! Indicador não definido.
3.2. Proteomics of ejaculate spermatozoa and seminal plasma	Erro! Indicador não definido.

3.3. <i>Proteomics of epididymal spermatozoa and epididymal fluid</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4. <i>Proteomics of ejaculated and epididymal spermatozoa</i> ..	Erro! Indicador não definido.
4. Discussion	66
5. Acknowledgements	74
6. Conflict of interests	74
7. References	74
CAPÍTULO 3	69
ANEXO 1 - Dados das 16 proteínas <i>up-regulated</i> nos espermatozoides ejaculados quando comparadas as do plasma seminal pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	89
ANEXO 2 - Dados das proteínas <i>up-regulated</i> no plasma seminal quando comparadas as dos espermatozoides ejaculados pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	91
ANEXO 3 - Proteínas <i>up-regulated</i> nos espermatozoides do epidídimo quando comparadas as do fluído epididimário pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	93
ANEXO 4 - Dados das proteínas <i>up-regulated</i> no fluído epididimário quando comparadas as dos espermatozoides do epidídimo pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	998
ANEXO 5 - Proteínas <i>up-regulated</i> nos espermatozoides ejaculados quando comparadas as dos espermatozoides do epidídimo pela análise de <i>fold change</i> e test-t.	100
ANEXO 6 - Proteínas <i>up-regulated</i> nos espermatozoides do epidídimo quando comparadas as dos espermatozoides ejaculados pela análise de <i>fold change</i> e test-t. ...	101

RESUMO

PAULO, O.L.O.H. PERFIL PROTEICO DOS ESPERMAZOIDES DO EJACULADO E DO EPIDÍDIMO DE CÃES: EM BUSCA DE UM ANTÍGENO ESPERMÁTICO PARA CONTRACEPÇÃO. Botucatu – SP. 2019. 47p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Vacinas contraceptivas têm sido propostas como uma forma mais rápida e menos invasiva para esterilização de cães. Este estudo objetivou descrever a relação entre as proteínas das células espermáticas ejaculadas e do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário, produzindo base experimental para o design destas vacinas. Para isso, utilizou-se 5 cães ($n = 5$), dos quais foram obtidos o ejaculado e, após a orquiectomia, o produto da recuperação da cauda do epidídimo. As amostras foram submetidas a avaliação da concentração, morfologia, cinética espermática, citometria de fluxo e teste de ligação em membrana perivitelínica de ovo, sendo separadas em 4 grupos: plasma seminal (PS), fluido epididimário (FE), espermatozoides do ejaculado (EJAC) e do epidídimo (EPID). Para análise proteômica a digestão das proteínas dos 4 grupos foi feita *in gel* e avaliadas em espectrômetro de massas Q-Tof. Os parâmetros de motilidade progressiva, retilinearidade, linearidade, coeficiente de oscilação, produção de H_2O_2 e percentagem de membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada foram mais expressivos ($P < 0,01$) no grupo EJAC do que no EPID. Foram encontradas 177 proteínas entre EJAC e PS (16 *up-regulated* no EJAC e 14 no PS); 241 proteínas entre EPID e FE (27 *up-regulated* no EPID e 14 no FE); e 210 proteínas entre EJAC e EPID (3 *up-regulated* no EJAC e 17 no EPID).

Palavras-chave: canino, epidídimo, plasma seminal, proteômica, viabilidade espermática

ABSTRACT

PAULO, O.L.O.H. PROTEIN PROFILE OF SPERMATOZOA FROM EJACULATED AND EPIDIDYMIS OF DOGS: SEARCHING FOR A SPERMATIC ANTIGEN FOR CONTRACEPTION. Botucatu – SP. 2019. 47p. Thesis (Doctoral Degree) – School of Veterinary Medicine and Zootechnics, Campus Botucatu, São Paulo State University.

Contraceptive vaccines has been proposed as a faster and less invasive way to sterilize dogs. This study aimed to describe the relation between proteins of ejaculated sperm cells and epididymis, seminal plasma and epididymal fluid, producing an experimental basis for designing these vaccines. For this, 5 dogs (n = 5) were used, from which the semen and, after orchiectomy, the epididymis tail recovery product was obtained. Samples were submitted to concentration, morphology, sperm kinetics, flow cytometry and egg perivitellin membrane binding test analysis, and separated into 4 groups: seminal plasma (PS), epididymal fluid (EF), ejaculate spermatozoa (EJAC) and epididymis spermatozoa (EPID). For proteomic analysis the protein digestion of the 4 groups was performed in gel and evaluated by Q-Tof mass spectrometer. The parameters of progressive motility, rectilinearity, linearity, wobble, H₂O₂ production and percentage of plasma membrane integrity and damaged acrosomal membrane were more expressive (p <0.01) in the EJAC group than in EPID group. 177 proteins were found between EJAC and PS (16 up-regulated in EJAC and 14 in PS); 241 proteins between EPID and FE (27 up-regulated in EPID and 14 in FE); and 210 proteins between EJAC and EPID (3 up-regulated in EJAC and 17 in EPID).

Keywords: canine, epididymis, proteomics, seminal plasma, sperm viability

CAPÍTULO 1

1 – Introdução e justificativa

No Brasil, existem 52,2 milhões de cães, 22,1 milhões de gatos e quatro milhões de outros pets. Em média, as cidades brasileiras possuem uma relação de um cão para cada seis habitantes e um gato para cada 16 habitantes (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015). É difícil computar o número de animais não domiciliados ou errantes, muitos deles resultados de crias indesejadas e abandono. Contudo sua superpopulação é um risco tanto para a saúde pública, com a transmissão de zoonoses e ataques a seres humanos, quanto para os animais que ficam sujeitos a maus tratos e privação de alimento. (LIMA et al., 2010). Há também o risco destes animais influenciarem negativamente espécies ameaçadas nativas, seja por predação ou por competição interespecífica, independentemente de estarem em áreas protegidas ou da densidade populacional local (LESSA et al., 2016). Diferentes trabalhos apontam que esta é uma questão de relevância internacional (BUTLER et al., 2004; BUTLER; DU TOIT, 2002; REECE et al., 2008; REESE, 2005; NATOLI et al. 2006). Desta forma, faz-se necessário o controle de natalidade destes animais, a fim de reduzir as consequências da superpopulação.

A esterilização cirúrgica é o método mais utilizado em pequenos animais para o controle populacional, embora seja uma técnica invasiva e de custo elevado, que requer anestesia, profissionais qualificados, equipamentos próprios e centros cirúrgicos para realizá-la, além de cuidados pós-operatórios. Com isso, o interesse em métodos não cirúrgicos de controle populacional de animais vem aumentando cada vez mais, sobretudo em países em desenvolvimento (DONAVAN, et al., 2012; PALMER et al., 2018).

Vacinas contraceptivas ou esterilizantes têm sido estudadas como método contraceptivo para animais e humanos. Na medicina veterinária, busca-se por uma vacina esterilizante que não necessite de reaplicações para alcançar seu efeito e que tenha longa durabilidade. Vacinas contraceptivas são produzidas contra os hormônios da reprodução e contra antígenos relacionados aos gametas (espermatozoides ou ovócitos) (MEEUSEN et al., 2007).

O desenvolvimento de uma vacina contraceptiva objetiva alcançar uma resposta imune capaz de bloquear uma parte do processo reprodutivo de forma segura e eficaz. Vacinas baseadas nos hormônios da reprodução visam

neutralizar os níveis circulantes dos mesmos, enquanto as baseadas nos antígenos de óvulos e espermatozoides buscam interferir no processo de fertilização (ALEXANDER, BIALY, 1994). O entendimento de que anticorpos obtidos contra hormônios e gametas estão associados com a infertilidade embasam a possibilidade de usar a imunização como método contraceptivo (PRIMAKOFF et al., 1990). Este método inicia-se com a identificação de componentes essenciais para o processo reprodutivo. A partir deste conhecimento, uma versão recombinante é gerada e expressa em sistemas específicos para a produção em larga escala. O antígeno sintético é combinado com uma molécula carreadora e utilizado como vacina injetável ou oral. A formulação estimula o sistema imunológico a gerar uma resposta contra o antígeno específico, suprimindo a fertilidade. Dois tipos de resposta imune são gerados: humoral (anticorpos circulantes) que bloqueia a fertilidade por se ligar e bloquear a função do antígeno no trato reprodutor; e a celular (células T) que destrói diretamente a célula produtora do antígeno, causando esterilidade permanente (SCHILLER, 2010). Assim, a vacinação com antígenos espermáticos (peptídeos recombinantes, peptídeos sintéticos ou DNA) causam contracepção de machos e fêmeas por induzir a resposta sistêmica e anticorpos antiespermatozoides locais (NAZ, 2011a).

Modernas técnicas de biologia molecular, como o estudo do proteoma espermático, podem ser empregadas para produzir base experimental para o design de inibidores de pequenas moléculas com efeitos antifertilidade (SURI, 2005, 2007).

A análise proteômica consiste no campo de pesquisa que trata da identificação em larga escala dos componentes proteicos expressos pelo genoma (ANDERSON; ANDERSON, 1998). Na reprodução animal, a análise proteômica pode desempenhar importante papel na identificação de proteínas que possam ser estabelecidas como marcadores de fertilidade para a seleção de reprodutores, ou ainda, na seleção de ejaculados com maior tolerância ao processo de congelação/descongelação, diminuindo gastos e potencializando os resultados (BARROS et al., 2013). Resultados destes estudos têm encontrado diferentes moléculas relacionadas à fertilidade, incluindo algumas capazes de promover a contracepção. No cão, poucos estudos envolvendo proteínas provenientes do

plasma seminal e da membrana espermática foram conduzidos com este propósito, apesar da necessidade e busca continua por um método contraceptivo de baixo custo e pouco invasivo para o controle populacional na espécie.

O objetivo deste estudo é descrever a relação entre as proteínas das células espermáticas ejaculadas e do epidídimo, do plasma seminal e do fluido epididimário e estabelecer uma relação entre as proteínas de destaque nestes grupos e a capacidade de concepção de um novo indivíduo.

2. Revisão de Literatura

2.1. Espermatogênese

O processo de formação contínua dos espermatozoides é denominado espermatogênese. Este processo inicia-se na puberdade e continua por toda a vida do macho envolvendo diferentes etapas: mitose celular, que promove a renovação de espermatogônias; divisão e diferenciação das espermatogônias; meiose celular visando a redução do número de cromossomos, que permita, após a fecundação do ovócito, a geração de uma célula diploide com os genes maternos e paternos; e a espermiogênese, que é a diferenciação da célula haploide com formato arredondado, comum a outras células, em uma estrutura diferenciada e complexa denominada espermatozoide (FOOTE et al.,1972).

A espermatogênese ocorre no interior dos túbulos seminíferos, estruturas espiraladas que compõem a maior parte do parênquima testicular. Entre os túbulos seminíferos há um tecido intersticial, no qual estão localizadas as células de Leydig, produtoras de testosterona, vasos sanguíneos e linfáticos, além de nervos e tecido conjuntivo (Figura 1, FAWCETT et al.,1973).

Cada túbulo seminífero é envolto por uma membrana basal que os separa do tecido intersticial. A separação entre os tecidos é denominada barreira hemato-testicular, composta por células mióides peritubulares e pela justaposição dos processos citoplasmáticos das células de Sertoli contíguas, com junções comunicantes, próximas do local que iniciam-se as meioses celulares (FAWCETT et al., 1970). Esta barreira tem como função criar um ambiente adequado à diferenciação das células em espermatozoides, impedir a passagem de substâncias de alta massa molecular e a ação do sistema imunológico, que passaria a reconhecer as células haploides como estranhas ao organismo

(MRUK; CHENG, 2004).

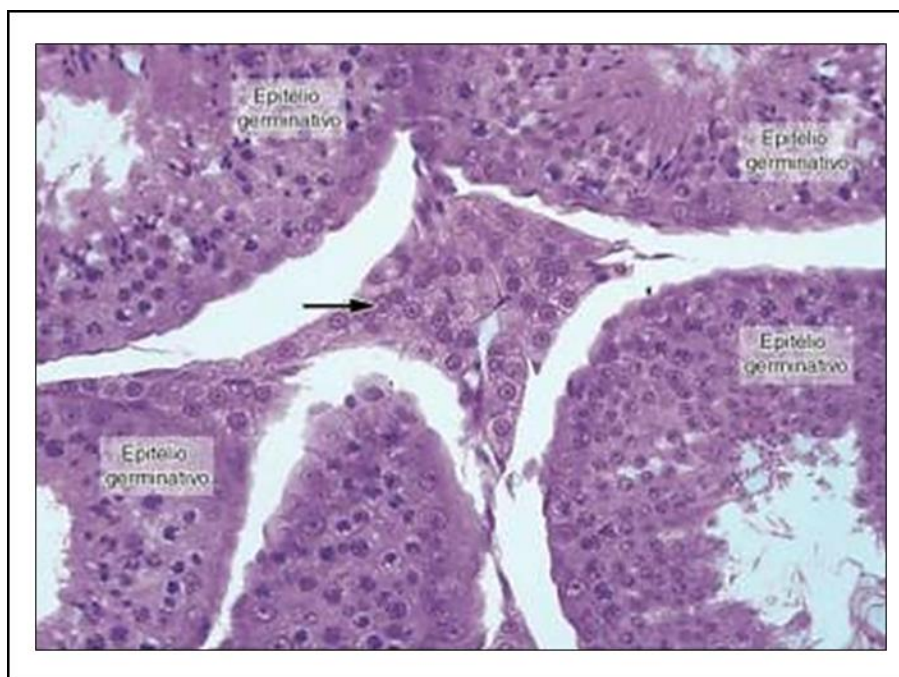


Figura 1. Túbulos seminíferos e tecido intersticial. A seta aponta as células de Leydig e o epitélio germinativo. Fonte JUNQUEIRA e CARNEIRO (2013).

Já os túbulos seminíferos são compostos por três compartimentos, basal, adluminal e lúmen. O compartimento basal é composto por células diploides, que ainda não passaram pela meiose, enquanto que o compartimento adluminal compreende as células que passaram ou estão passando de meiose, tornando-se haploides. Este processo de diferenciação se dá a partir da membrana basal em direção ao lúmen do túbulo seminífero conforme ocorre a divisão celular. Assim, próximas da membrana basal estão as espermatogônias que vão se diferenciando em espermatócitos primários e secundários, espermatídes redondas (iniciais) e alongadas (finais) e, quando junto ao lúmen, em espermatozoides (Figura 2, FOOTE et al., 1972).

Na face interna dos túbulos seminíferos, ao longo de toda sua extensão, estão dispostas as células de Sertoli, cuja função é nutrir e sustentar as células germinativas que darão origem aos espermatozoides. A espermatogênese é dividida em 3 fases: espermatocitogênese, de meiose e espermiogênese (JOHNSON et al., 1997). Na fase de espermatocitogênese, as espermatogônias do tipo A (células tronco) ou primordiais sofrem uma série de divisões mitóticas,

originando espermatogônias intermediárias e posteriormente do tipo B. Esta fase é importante para a renovação das células tronco. Após mais uma divisão por mitose, originam os espermatócitos primários. A partir deste ponto inicia-se a fase meiótica, a qual envolve os espermatócitos primários e secundários para a formação de espermátides redondas (iniciais) haploides. A terceira fase é a de diferenciação ou espermiogênese, que não envolve divisões celulares e as espermátides redondas se alongam dando origem aos espermatozoides (Figura 3).

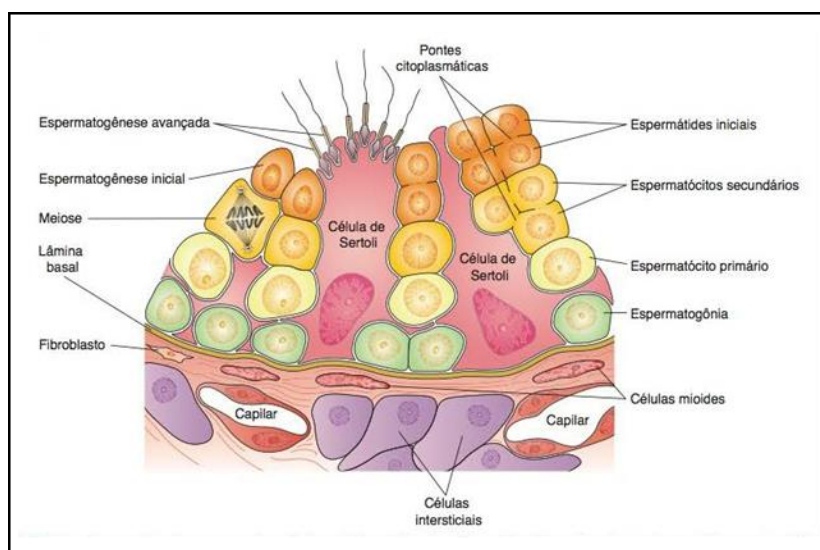


Figura 2. Segmento do túbulo seminífero e tecido intersticial mostrando a formação do epitélio seminífero e populações celulares. Fonte: JUNQUEIRA e CARNEIRO (2013).

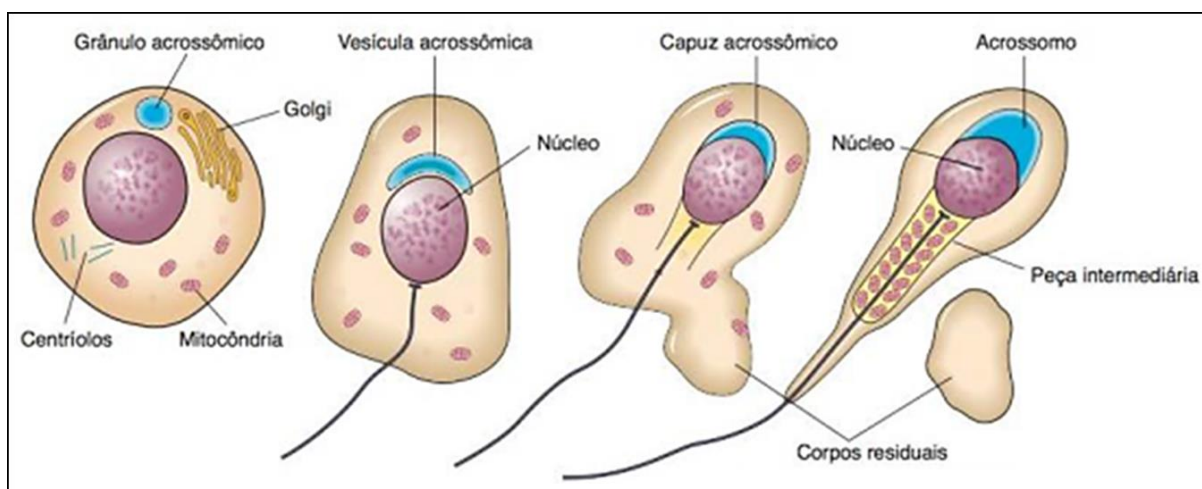


Figura 3. Modificações das espermátides para formação dos espermatozoides, durante a espermiogênese. Fonte: JUNQUEIRA e CARNEIRO (2013).

Esta diferenciação compreende a formação do acrossoma pelo aparelho de Golgi, da cauda pelos centríolos, a formação da peça intermediária contendo as mitocôndrias e a condensação do núcleo, quando as proteínas da cromatina (histonas) aumentam sua quantidade de arginina, cisteína e o número de pontes dissulfeto. O espermatozoide formado é então liberado no lúmen do túbulo seminífero e conduzido ao epidídimo para maturação (JOHNSON et al., 1997).

Uma vez liberados no lúmen, os espermatozoides, imersos em um fluido produzido pelas células de Sertoli e composto por diferentes moléculas e íons, são conduzidos aos túbulos retos, localizado no mediastino testicular, que compõe a rede testicular ou *rete testis* que desembocam nos ductos eferentes, cuja junção resultará no ducto epididimário (O'DONNEL et al., 2011).

No cão, a espermatogênese ocorre em um intervalo de 62 dias, ou seja, 4,5 vezes a duração de um ciclo espermático que é de 13,6 dias (JOHNSTON et al., 2001).

2.2. Composição do espermatozoide e fisiologia do movimento

O espermatozoide, ao final de sua diferenciação celular, é dividido em cabeça e cauda e é recoberto por membrana plasmática em toda sua extensão. O interior da cabeça espermática contém o material genético condensado que será usado na formação do zigoto. Em sua porção anterior e recobrindo a cabeça do espermatozoide, encontra-se o conteúdo acrossomal, delimitado pelas membranas acrossomais interna e externa. O conteúdo acrossomal é composto por enzimas, cujo principal papel está envolvido na superação da zona pelúcida que envolve o ovócito (GARNER, HAFEZ, 2004).

O axonema é a principal estrutura da cauda do espermatozoide e é formada por nove pares de microtúbulos periféricos distribuídos em torno de um par de microtúbulos centrais. Os microtúbulos são compostos principalmente pelas proteínas α e β tubulinas, sendo que cada microtúbulo é formado por um conjunto de duas subfibras A e B. De cada par de microtúbulos externos, a partir da subfibra A, projetam-se um braço externo e um interno formados por uma proteína chamada de dineína, constituindo a força motriz que movimentará a cauda do espermatozoide. Existem também nove estruturas radiais que partem dos microtúbulos periféricos em direção aos microtúbulos centrais, em um padrão

helicoidal, e uma proteína de ligação chamada nexina que ajuda a dar estabilidade ao conjunto (RAHME; HENRY, 2013).

A cauda do espermatozoide é subdividida em colo ou pescoço, peça intermediária, peça principal e peça terminal da cauda. O colo é o local de ligação entre a cabeça e a cauda do espermatozoide. A peça intermediária é a região na qual as mitocôndrias estão alinhadas em torno da cauda. Neste ponto, a cauda possui nove fibras densas externas, que se colocam ao redor dos microtúbulos periféricos do axonema e são envolvidos por uma bainha mitocondrial exclusiva da peça intermediária. Entre as peças intermediária e principal existe uma estrutura chamada *anulus* que as delimita. A peça principal, além de não possuir a bainha mitocondrial tem o número de fibras densas reduzidas de 9 para 7, uma vez que as fibras densas 3 e 8 dão lugar a colunas longitudinais de bainhas fibrosas que são interconectadas por estruturas chamadas de costelas que conferem estabilização as mesmas. Estas colunas longitudinais são estruturas exclusivas da peça principal. A peça terminal é a parte final da cauda onde existe apenas o axonema envolto pela membrana plasmática (Figura 4 e 5, TURNER, 2003).

Os movimentos da cauda são responsáveis pela motilidade e propulsão do espermatozoide. Em mamíferos, existem dois tipos de movimentos, o ativo e o hiperativo (SUAREZ; OSMAN, 1987). O movimento ativo é simétrico e de baixa amplitude, sendo adequado para que o espermatozoide se desloque do modo retilíneo, a fim de ultrapassar o útero e chegar à tuba uterina (TURNER, 2006). O movimento hiperativo é assimétrico, de alta amplitude e ocorre após a capacitação do espermatozoide, facilitando sua aproximação e penetração no ovócito (HO; SUAREZ, 2001).

Para que o espermatozoide se movimente é preciso uma fonte de energia como o ATP, que é obtido, assim como em outras células, pelo processo de respiração mitocondrial. Diferentemente de outras células, as mitocôndrias do espermatozoide possuem uma variedade de enzimas que, quando desequilibradas, geram defeitos no metabolismo mitocondrial, sem afetar as demais células somáticas (TURNER, 2006).

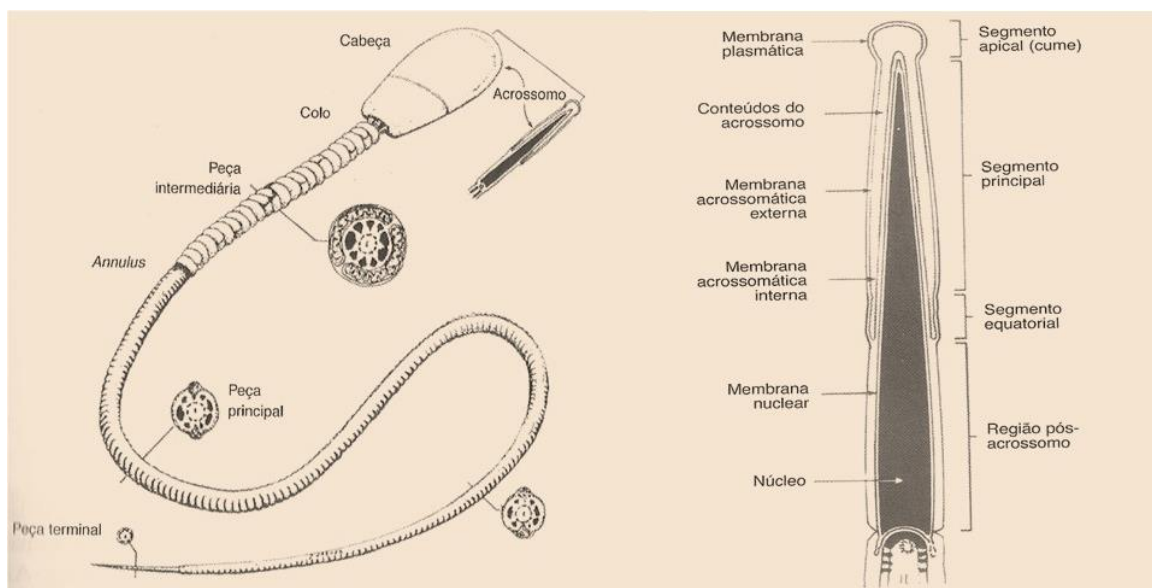


Figura 4. Porções da célula espermática (Fonte: adaptado de GARNER; HAFEZ, 2004).

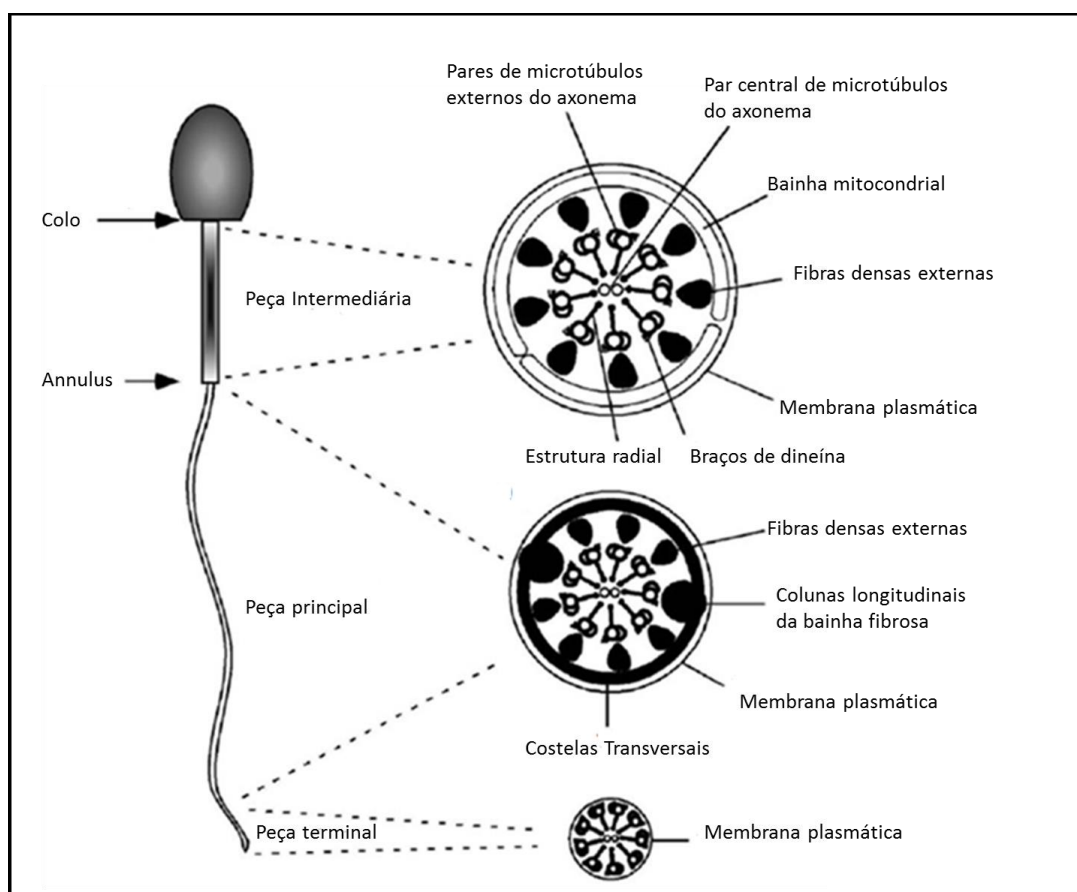


Figura 5. Estrutura do flagelo do espermatozoide de mamíferos (Fonte: adaptado de TURNER, 2003).

Foram demonstradas diferenças metabólicas relacionadas a espécie nas mitocôndrias espermáticas, influenciando na capacidade dos espermatozoides de diferentes espécies em metabolizar diferentes substratos. Isto pode estar relacionado com as diferenças no substrato encontrado no aparelho reprodutor das fêmeas de cada espécie e pode explicar a necessidade de se utilizar diferentes meios extensores para diferentes espécies (STOREY, KAYNE, 1980).

Além da atividade mitocondrial, que é restrita a peça intermediária, o espermatozoide obtém a maior parte da energia requerida para a movimentação de sua cauda pela glicólise realizada ao longo das colunas da bainha fibrosa presentes na peça principal (TURNER, 2006).

O início da movimentação da cauda do espermatozoide é regulado principalmente pela ação da adenosina monofosfato cíclica (*cAMP*) sobre a ativação da proteína quinase A (*PKA*) e pela variação dos níveis de cálcio na célula espermática (RAHME; HENRY, 2013).

De forma simplificada, a movimentação do espermatozoide inicia pela ativação da ATPase dineína, que causa a ligação e contração dos braços de dineína e promovendo o deslizamento dos pares de microtúbulos de uma hemiparte da cauda do espermatozoide, enquanto a outra parte permanece em repouso. A seguir, os microtúbulos ativados voltam a posição de repouso e em seguida os da outra hemiparte são ativados. Esta condição vai se alternando e, desta forma, conforme estes túbulos deslizam entre si a cauda do espermatozoide se dobra, produzindo o movimento (Figura 6, TURNER, 2003).

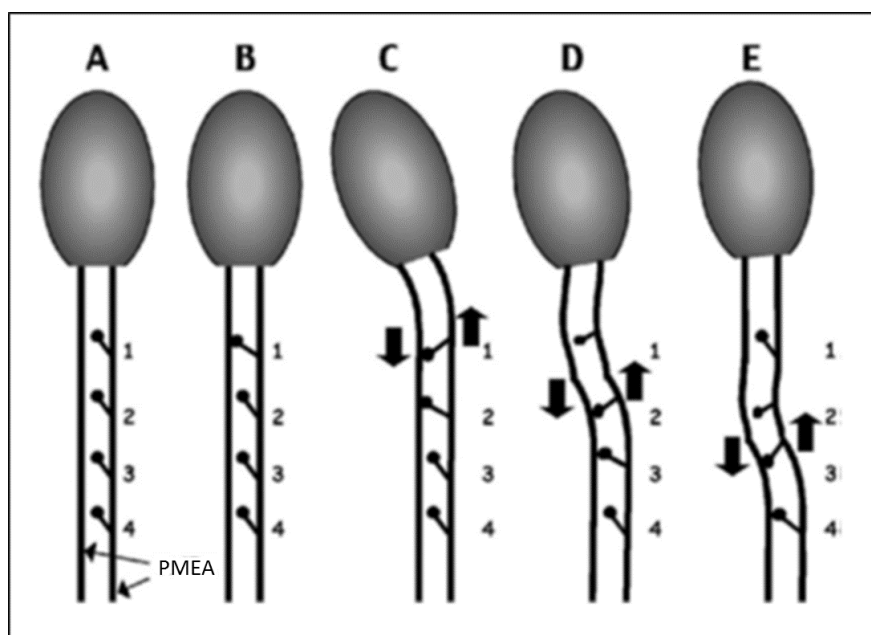


Figura 6. Mecanismo de movimento espermático simplificado no qual a dineína do axonema gera a frequência flagelar. As linhas paralelas representam os pares de microtúbulos externos do axonema (PMEA). As estruturas numeradas representam os braços de dineína entre os PMEAs. (A) Nenhum dos braços de dineína está ativo e não há curvatura flagelar. (B) O primeiro braço de dineína se ligou ao par de microtúbulos adjacente. (C) O primeiro braço de dineína gerou um movimento para baixo, resultando em microtúbulos adjacentes passando um pelo outro (setas grandes). Como os dois pares de microtúbulos estão ancorados na cabeça do espermatozóide, essa força deslizante é traduzida em uma curva do axonema - o início de uma batida flagelar. Além disso, o segundo braço de dineína se ligou ao par de microtúbulos adjacente. (D) O primeiro braço de dineína liberou o par de microtúbulos adjacente, enquanto o segundo braço de dineína gerou um movimento para baixo. Isso resulta na propagação da curvatura flagelar ao longo do comprimento dos microtúbulos. O terceiro braço de dineína se ligou ao microtúbulo adjacente. (E) O batimento flagelar está sendo propagado pelo movimento descendente do terceiro braço de dineína, enquanto o segundo braço de dineína libera o par de microtúbulos adjacente e o primeiro braço de dineína retorna à sua posição original, preparando-se para outro movimento. Essa sequência acontece para todos os 9 pares de braços de dineína e seus 9 pares de microtúbulos externos associados de maneira assíncrona, mas coordenada, ao redor da circunferência e ao longo de todo o comprimento do flagelo, resultando em um batimento flagelar normal. (Fonte: TURNER, 2003)

2.3. Maturação espermática

O espermatozoide liberado no lúmen dos túbulos seminíferos, ainda está imaturo e, para que possa fertilizar o ovócito, deve passar por um processo de maturação que ocorre no epidídimo ao entrar em contato com os componentes do fluido epididimário, secretados por suas células estruturais (JERVIS; ROBAIRE, 2001).

O epidídimo é uma estrutura adjacente ao testículo, que pode ser anatomicamente dividida em cabeça, corpo e cauda. Na cabeça e corpo ocorre a maturação, enquanto na cauda, o espermatozoide maturo é armazenado em um estado de quiescência, obtido pelo controle de pH e pelos baixos níveis de cálcio (GARNER; HAFEZ, 2004).

O fluido epididimário é composto principalmente por proteínas e lipídios oriundos das secreções do epitélio epididimário (GUYONNET et al., 2011), controladas principalmente pela di-hidrotestosterona (TURNER, 1991).

Durante o processo de maturação ocorre o aumento da compactação do DNA no núcleo do espermatozoide, aumento da concentração intracelular de adenosina monofosfato (AMPc), aumento da permeabilidade e alterações na membrana plasmática influenciando o potencial mitocondrial e motilidade espermática, e migração da gota citoplasmática para a porção distal da cauda do epidídimo (HENRY; ECHEVERRY, 2013).

2.4 Ejaculação

Para que a ejaculação ocorra é preciso que o macho apresente ereção peniana. A ereção canina ocorre por estímulo olfativo, despertado pela ação de feromônios liberados pela fêmea no período do estro, ou mesmo pela associação entre a rotina de tratamento e o coito (ENGLAND, G.C.W., 2013).

Para que a ereção aconteça, é preciso a ação de impulsos vindos dos nervos erigentes, que são compostos de fibras parassimpáticas oriundas das fibras dos nervos sacrais e pélvicos. Estes impulsos levam a dilatação das artérias pudendas externa e interna, alimentando de sangue o corpo cavernoso do pênis. Ocorre então a contração dos músculos isquiouretrais que limita o retorno venoso da área. O sangue retido causa a intumescência do bulbo peniano e a elongação da glândula. O intumescimento do bulbo peniano impede a retirada

do pênis do trato genital feminino, prevenindo o refluxo espermático enquanto acontece a ejaculação (KUTZLER, 2005)

Na sequencia o macho instintivamente vira-se de costas para a cadela, promovendo a rotação peniana em 180° em direção caudal. O osso peniano do cão previne a oclusão do óstio uretral durante e ereção e rotação peniana (GRANDAGE, 1972).

A ejaculação acontece pela estimulação dos nervos simpáticos do pênis, que geram contrações dos músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso, impelindo o conteúdo dos ductos deferentes e fluido prostático para o canal da uretra (KUTZLER, 2005).

O ejaculado canino possui três frações distintas. A primeira e a última são produzidas pela próstata, que é a única glândula acessória presente na espécie (ENGLAND, ALLEN, 1990). A primeira fração tem a ação de limpar o canal da uretra para que urina ou debris celulares não influenciem negativamente no sêmen. Durante o acasalamento esta primeira fração acaba sendo descartada antes da penetração na fêmea (ENGLAND, G.C.W., 2013). A terceira fração tem a função de impelir a segunda fração, ejaculada na porção cranial da vagina, diretamente para o útero, onde o aumento das contrações uterinas causadas pelo acasalamento conduz o sêmen viável ao corno uterino e estimula a eliminação de espermatozoides mortos e outros possíveis contaminantes do útero (ENGLAND et al., 2006).

A segunda fração é a rica em espermatozoides e é proveniente do ducto deferente, sendo ejaculada após o intumescimento do bulbo peniano. Com o término da ejaculação, a ereção termina e o pênis pode ser removido da cadela (ENGLAND, G.C.W., 2013).

Espermatozoides armazenados em fluido prostático tornam-se menos viáveis do que os armazenados em meios extensores. Entretanto durante a cópula é provável que o fluido prostático atue juntamente com o plasma seminal prevenindo que o sêmen seja prejudicado por células polimorfonucleares e colaborando no preparo do substrato do trato reprodutor da cadela, modulando efeitos inflamatórios locais causados pela deposição do sêmen no canal vaginal (ENGLAND et al., 2013).

2.5. Reação do acrossomo e fertilização

Ao chegar próximo ao ovócito, sob influência da progesterona e do cálcio, o espermatozoide sofre um processo denominado reação do acrossomo, que se liga a zona pelúcida e promove a liberação das enzimas presentes no acrossoma, permitindo assim que o mesmo ultrapasse esta barreira. Esta ligação é espécie específica e ocorre pela ligação com proteínas, chamadas de *egg binding proteins*, localizadas na membrana da cabeça do espermatozoide (HENRY; ECHEVERRY, 2013).

Após superar a zona pelúcida, a membrana acrossomal interna liga-se a membrana do óvulo, para a fertilização. Este mecanismo é conduzido via ação de proteínas de superfície celular, chamadas ADAM (desintegrina A e metaloprotease) (WOLFSBERG; WHITE, 1996).

2.6. Proteômica dos espermatozoides e fluídos

2.6.1. Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal é um fluido composto por um conjunto de secreções do testículo, epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Conhecer a composição deste fluido auxilia na compreensão dos mecanismos que envolvem a função espermática antes e após a ejaculação (AQUINO-CORTEZ et al., 2017).

Evidências sugerem que o plasma seminal exerce múltiplos efeitos na função espermática e no trato genital feminino. Uma característica essencial da maturação pós-testicular é a remodelação da superfície espermática por interações específicas de proteínas e glicoproteínas, as quais são secretadas no trato feminino e estão também presentes no plasma seminal. Proteínas secretórias, ligadas aos espermatozoides, parecem estar envolvidas no estabelecimento dos reservatórios espermáticos na tuba uterina, no controle da capacitação espermática pela ação negativa (fatores decapacitantes), como fatores de regulação positiva (estimulação da capacitação) e nos eventos iniciais e centrais do processo de fertilização, estabelecendo um reservatório de espermatozoides na tuba uterina, modulando a capacitação e a interação dos gametas (MANJUNATH e THERIEN, 2002; TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

No cão, o plasma seminal é composto pela secreção de apenas uma glândula sexual acessória, a próstata, cujas funções são andrógeno dependentes

(DUBÉ et al., 1983; FRENETTE et al., 1987; ENGLAND, ALLEN, 1990). Essas secreções, em grande parte, são proteínas enzimáticas (ISACS; COFFEY, 1984), e a principal delas é arginina esterase, conhecida como proteína específica prostática canina (*Canine Prostatic Arginine Esterase - CPSE*) (CHAPDELAINE et al. 1984; McENTEE et al., 1987), consistindo 90% das proteínas secretadas pela próstata e 30% das proteínas do plasma seminal (DUBÉ, 1994). Foi descrito um alto grau de afinidade entre a arginina esterase do plasma seminal e uma HBP (*Heparin Biding Protein*) equina (SSP-7) (CALVETE et al., 1995). O significado in vivo da sua atividade proteolítica ainda permanece desconhecido, alguns autores sustentam a hipótese de que a CPSE se liga ao espermatozoide, assim, a enzima poderia catalisar proteínas na superfície espermática ou poderia ser transportada como proteína “ligada” e agir em sítios distantes (DUBÉ, 1994).

No cão, Souza et al. (2002), utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições desnaturantes, encontraram no plasma seminal 25 bandas, com pesos moleculares variando de 136 kDa a 3,5 kDa, em 5 cães de fertilidade desconhecida. Posteriormente, com um número maior de cães (n=20), foram identificadas 37 bandas e verificou-se uma correlação positiva entre a densitometria de duas bandas proteicas (67 kDa e 58,6 kDa) e a motilidade espermática, vigor e testes que avaliaram a integridade e funcionalidade da membrana espermática (SOUZA, 2003; SOUZA et al., 2007). Semelhantemente, Cheema et al. (2011), em estudo com plasma seminal de cães (n=5), correlacionaram positivamente proteínas com pesos moleculares de 82 kDa, 70 kDa, 24 kDa e 14 kDa com a motilidade espermática, porcentagem de espermatozoides vivos e integridade de membrana.

Souza et al. (2006) identificaram um grupo de proteínas com afinidade de ligação à heparina no plasma seminal e, posteriormente, na membrana espermática de cães (SOUZA et al., 2008). Estes autores sugeriram que uma destas proteínas poderia ser uma subunidade (15,6 kDa) da arginina esterase do plasma seminal canino, a qual, em estudo posterior (SOUZA et al., 2009) foi marcada com um anticorpo antiosteopontina bovina, uma proteína identificada em touros de alta fertilidade por Killian et al. (1993) e caracterizada por Cancel et al. (1997). Martins (2005) também sugeriu que uma banda de peso aproximado a 15,6 kDa poderia ser uma subunidade da arginina esterase e determinou uma

correlação positiva entre a densitometria desta banda e a motilidade espermática e integridade da membrana do sêmen fresco ou descongelado.

Dubé et al. (1985), analisaram e compararam as características físico-químicas das proteínas arginina esterase prostática canina (canine prostatic arginine esterase - CPSE) e antígeno específico da próstata (prostatic specific antigen – PSA) de humanos. Verificou-se que, apesar de distintas, possuem semelhanças como pesos moleculares similares (29 KDa para CPSE e 34 KDa para o PSA) e atividades enzimáticas similares frente a substratos proteicos, o que sugere que o cão possa atuar como modelo em estudos relacionados a PSA.

A osteopontina (OPN) foi descrita como presente no plasma seminal de cães (SOUZA et al., 2009). Em outras espécies a OPN foi relacionada positivamente com fertilidade, a exemplo em touros (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997; SOUZA et al., 2008), em garanhões (BRANDON et al., 1999; WAHEED et al., 2013) em búfalos (PERO et al., 2006), em humanos (EL-HAGGAR et al., 2013) e em várias outras espécies (DRUART et al., 2013). Esta proteína tem atuação em processos de adesão celular, ossificação e estabilização da membrana plasmática durante a criopreservação espermática (BARUAH et al., 2017).

Souza et al. (2008; dados não publicados) também estudaram o proteoma do plasma seminal e da membrana espermática de cães por eletroforese bidimensional e identificaram correlações entre diferentes spots e as características do sêmen fresco e descongelado e aos resultados do teste de ligação/penetração em oócitos homólogos. Foram encontrados 179 e 87 *spots*, no plasma seminal e na membrana espermática, respectivamente. Dentre as várias correlações determinadas, as mais importantes foram: correlação positiva entre o spot 17,3 kDa, pI 9,7 da membrana espermática e número de espermatozoides após a descongelação ligados/penetrados aos oócitos e porcentagem de oócitos interagidos no teste de ligação/penetração em oócitos homólogos. No plasma seminal uma correlação negativa foi verificada entre o spot 28,9 kDa, pI 7,80 e a motilidade espermática do sêmen fresco. Na eletroforese de extratos da membrana espermática identificaram uma correlação positiva entre a banda 66,4 kDa e a motilidade total e progressiva do sêmen fresco; e entre a banda 54,6 kDa e a motilidade progressiva do sêmen fresco e a motilidade total e progressiva do

sêmen congelado.

Mogielnicka-Brzozowska et al. (2012), investigaram as proteínas de ligação ao zinco (*Zinc Binding Proteins – ZnBPs*) no plasma seminal de cães (n= 6) por meio de cromatografia e eletroforese. Foi observado que as proteínas de ligação ao zinco correspondem de 4 a 10% do total de proteínas presentes no plasma seminal. Neste grupo de proteínas, foram reveladas 13 bandas com peso molecular entre 11,6 kDa e 152,3 KDa. Dentre estas frações proteicas, verificou-se que as de peso molecular de 11.6 kDa e 14.3 kDa representam de 28 a 30% do total de proteínas de ligação ao zinco encontradas no plasma seminal. Em um estudo subsequente, Mogielnicka-Brzozowska et al. (2014), demonstraram a importância das proteínas de ligação ao zinco (*Zinc Binding Proteins – ZnBPs*) na manutenção dos parâmetros de motilidade dos espermatozoides refrigerados a 5°C por meio da proteção da membrana espermática contra o choque térmico.

As arilsulfatases (Arylsulfatase) são proteínas que foram encontradas no plasma seminal de diferentes espécies, incluindo o cão, e que estão relacionadas com a capacitação espermática e com a deterioração mais acelerada em células espermáticas preservadas em plasma seminal (GADELIA et al., 1991).

A lactoferrina (*Lactoferrin*) foi descrita no plasma seminal canino e, a despeito de que ainda não tenha sido elucidado seu papel nesta espécie, é uma proteína homóloga a transferrina (*Transferrin*), que é secretada pelas células de sertoli (HOLMES et al., 1984; SKINNER, GRISWOLD, 1980) e tem papel importante no fornecimento de ferro para as células germinativas em desenvolvimento, sendo um importante indicador da função gonadal em humanos (BARTHLEMY et al., 1988; FORESTA et al., 1986) e touros (GILMONT et al., 1990). Entretanto, Kikuchi et al. (2003) relacionaram a lactoferrina e não a transferrina com a concentração espermática de cães.

A ação da enzima superóxido desmutase (*superoxid desmutase - SOD*) foi comprovada no plasma seminal de cães, sendo considerada importante para a proteção dos espermatozoides contra as espécies reativas de oxigênio (EROS) pelo o sistema de antioxidação enzimática (CASSANI et al., 2005). A catalase (CAT) também foi detectada no plasma seminal de cães, mas em menor quantidade, e quando teve seus efeitos comparados aos do superóxido desmutase, foi considerada menos importante para a proteção dos

espermatozoides contra os ROS (KAWAKAMI et al., 2006).

Em outro estudo, foi realizada a concentração de fosfatase ácida (*Acid Phosphatase - AP*), antígeno prostático específico (*Prostate Specific Antigen - PSA*) e arginina esterase prostática canina (*Canine Prostate Specific Esterase - CPSE*) no soro e plasma seminal de animais saudáveis e com hiperplasia prostática benigna, prostatite bacteriana e carcinoma prostático a fim de determinar se estas proteínas poderiam ser um marcador para detecção dessas afecções prostáticas. Verificou-se que estas proteínas podem ser detectadas no soro de animais acometidos por patologias prostáticas, sobretudo no caso de com hiperplasia prostática benigna. Não foi possível, contudo, correlacionar a concentração das proteínas com o carcinoma prostático, ou por ação das atividades das células cancerígenas sobre as proteínas ou pelo baixo número de animais testados no experimento (FORD et al., 1995). Entretanto, Amorim et al. (2004) conseguiram associar os índices de fosfatase ácida prostática (*prostatic acid phosphatase - PAP*) e do antígeno específico prostático (*prostatic specific antigen - PSA*), presentes no soro e urina de cães, com lesões prostáticas morfológicas, podendo ser usados como biomarcadores para este fim. .

Proteínas com ação enzimática como a *matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)* e a *matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)* foram detectadas no plasma seminal canino e relacionadas com elevada qualidade espermática e a baixa qualidade espermática, respectivamente, embora sua relevância na infertilidade ainda seja incerta (SAEGNSOI, et al., 2011).

Interessantemente, nos cães a expressão de proteínas nas frações do ejaculado canino são diferentes. Na segunda fração, que contém os espermatozoides, e na terceira, cujo conteúdo é prostático, a expressão de proteínas é maior e, embora a maioria das proteínas sejam detectadas em ambas frações, são descritas proteínas exclusivas para a fração rica em espermatozoides, com destaque para as proteínas *UPF0764 protein*, *C16orf89 homolog* e *epididymal-specific lipocalin-9* que se mostraram em maior quantidade. Estas proteínas foram correlacionadas com o processo de maturação e desenvolvimento do espermatozoide no epidídimo, e sugeriram que poderiam ser utilizadas como marcadoras de fertilidade. Também foram encontradas proteínas das membranas celulares e citoesqueleto de células espermáticas no plasma

seminal de cães, porém estas podem ser resultantes da ruptura celular resultante do congelamento das amostras durante seu preparo ou mesmo de uma interação fisiológica entre as células espermáticas e o plasma seminal durante a maturação e após a ejaculação (AQUINO-CORTEZ et al., 2017).

2.6.2. Proteínas do fluido epididimário

Martins et al. (2002) estudaram o perfil proteico do fluido epididimário canino e encontraram um padrão semelhante ao verificado no plasma seminal.

A fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase*), e carnitina (*Carnitine*) são duas proteínas encontradas no fluido epididimário, e sua presença no ejaculado de cães azoospermicos é considerada como marcador de obstrução da rede de ductos (JOHNSTON, 1991). Frenette et al. (1986) determinaram que a proteína fosfatase alcalina também presente no plasma seminal, em especial, na primeira fração do ejaculado canino, é originária da cauda do epidídimo, onde foi encontrada em concentração 10 vezes maior do que em outras partes do epidídimo. Isto demonstra que essa proteína está de alguma forma ligada à atividade de maturação da célula espermática.

A carnitina, por sua vez, está envolvida na beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos, atuando tanto na manutenção da membrana plasmática como na viabilidade das células espermáticas (ZOU et al., 2017).

Por meio de análise histoquímica Sinowatz et al. (1979) determinou a localização de quatro glicosidases (*Glycosidases*) no epidídimo canino. A β -Galactosidase mostrou-se presente ao longo de todo epidídimo e a β -N-Acetylglucosaminidase mostrou-se mais presente no corpo e cauda do epidídimo. A β -glucuronidase foi encontrada na cabeça do epidídimo; e α -mannosidase foi encontrada de forma discreta no corpo do epidídimo. Os autores relacionaram a ação destas enzimas à absorção de macromoléculas oriundas de espermatozoides mortos.

Também por análise histoquímica, Domeniconi et al. (2008), observaram pela primeira vez a aquaporina (*Aquaporin - AQP*) tipo AQP2 e AQP7 no epidídimo de mamíferos. Ito et al. (2008) determinaram a presença de aquaporina tipo AQP1 no espermatozoide canino e também no testículo canino através de análise com RT-PCR e anticorpos específicos pra AQP1. Foi postulado que a

aquaporina pode estar envolvida com o fluxo de água durante a criopreservação dos espermatozoides.

Beiglbök et al. (1998) verificaram que o mRNA de tamanho 1.5 kb, específico do epidídimo canino, codifica a proteína secretora tipo glutathione peroxidase, GPX5. As glutathione peroxidases (*Glutathione peroxidases* - GPXs) tem a função de proteger células e biomoléculas sensíveis como DNA, proteínas e lipídios de lesão oxidativa.

2.6.3. Proteínas da célula espermática

Raros estudos foram conduzidos a respeito do proteoma das células espermáticas de cães, apesar de estudos de proteínas isoladas (AQUINO-CORTEZ et al., 2017). A glutathione (*Glutathione*) e as enzimas glutathione redutase e peroxidase (*Glutathione reductase, peroxidase*) foram descritas, sugerindo a possibilidade de que as mesmas atuem como mecanismo protetor contra os processos oxidativos no espermatozoide, os quais podem causar lesões na membrana plasmática, da mesma forma com que atuam em outros tipos celulares (LI, 1975).

Torres et al. (2017) descreveram a presença da proteína no espermatozoide canino, sugerindo sua participação no processo de capacitação espermática, uma vez que os canais de panexina (*Panexine*) atuam de forma não seletiva para a passagem de íons como cálcio e potássio.

A relaxina (*Relaxine*) e seus receptores RXFP1 e RXFP2 foram isoladas em espermatozoides de cães adultos por Almeida et. al. (2016), contudo, sua função na fertilidade espermática permanece incerta.

Sabeur, et al. (2002) evidenciaram a presença da proteína hialuronidase PH-20 (*Hyaluronidase PH-20*) na membrana plasmática dos espermatozoides e também em espermátides caninas, sendo que sua atividade de ligação celular mostrou-se mais pronunciada quando em pH ácido.

Cheema et al. (2013) demonstraram em cães que as proteínas de superfície espermática hialuronidase PH-20, também chamada de molécula de adesão espermática-1 (*Sperm Adhesion Molecule 1 / SPAM-1*), localizadas principalmente na cabeça do espermatozoide, e a lactato desidrogenase 4 (*Lactate dehydrogenase C4 / LDH-C4*), localizada principalmente nas regiões pós-acrossomal e da peça intermediária dos espermatozoides, possuem propriedades

imun contraceptivas que podem ser exploradas.

Fernandez-Novell et al. (2004) testaram a atividade de uma hexoquinase de alta Km (*High-Km Hexokinase*) no espermatozoide canino, e verificaram a presença de uma atividade específica exercida por uma proteína tipo glucoquinase do espermatozoide canino (*Dog-Sperm Glucokinase-Like Protein - DSGLP*) no intervalo de 4–10 mM da concentração de glicose. Apesar de não se saber o papel fisiológico exato ou mecanismos de controle desta proteína, os autores acreditam que ela será de grande valia no controle e manutenção energético do ejaculado canino.

2.6.4. Vacinas contraceptivas

O método escolhido para o controle populacional de uma determinada espécie depende de diferentes fatores como segurança, eficiência, custo e consequências ambientais (BARFIELD et al., 2006; FERRO, MORDINI, 2004). Neste contexto, as vacinas contraceptivas têm sido propostas como alternativa mais rápida, barata e menos invasiva do que os procedimentos cirúrgicos para a esterilização. O ideal é que produza efeitos de longo prazo, reversível ou não, sem causar prejuízo à saúde e produzindo resultados restritos às funções reprodutoras do animal (NAZ, 2011b).

Vacinas contraceptivas vem sendo testadas desde os anos 1980 e seu desenvolvimento esbarra em problemas como: a necessidade de várias aplicações, variabilidade entre as respostas imunes de cada indivíduo, diminuição da resposta imune com o passar do tempo tornando o animal fértil novamente e efeitos colaterais provocados pelo uso de adjuvantes (MUNKS, 2012). Não obstante, as vacinas contraceptivas induzem resposta imune, humoral ou celular, contra moléculas inerentes aos indivíduos que se pretende imunizar, incluindo proteínas da superfície celular de espermatozoides e óvulos e hormônios relacionados à reprodução (KIRKPATRICK et al., 2011; ALEXANDER, BIALY, 1994; DELVES, et al. 2002).

Esta resposta imune pode resultar em interferência na produção e função de gametas e na implantação do zigoto. Quando a interferência pretendida se dá na implantação do zigoto, é preferível usar o termo vacina de controle de natalidade ao invés de vacina contraceptiva (FIGURA 7; NAZ, 2005; FERRO, MORDINI, 2004).

A vacina baseada em hCG é um exemplo de vacina de controle de natalidade, tendo seu uso restrito a primatas (FERRO, MORDINI, 2004). Existe ainda a possibilidade de se utilizar uma vacina contraceptiva baseada na proteína carreadora de riboflavina (RCP), que é a principal mediadora para os suprimentos vitamínicos do feto em mamíferos. Esta proteína é produzida no testículo e é encontrada no acrossoma dos espermatozoides (BHAT et al., 1995). Tais vacinas mostraram-se capazes de interferir na viabilidade embrionária antes e durante os estágios de peri-implantação embrionária em ratos (MURTY, ADIGA, 1982) e macacos (SESHAHIRI, ADIGA, 1987), e também influenciar negativamente a capacidade de fertilização do espermatozoide de ratos e macacos (SRIDHAR et al., 1996).

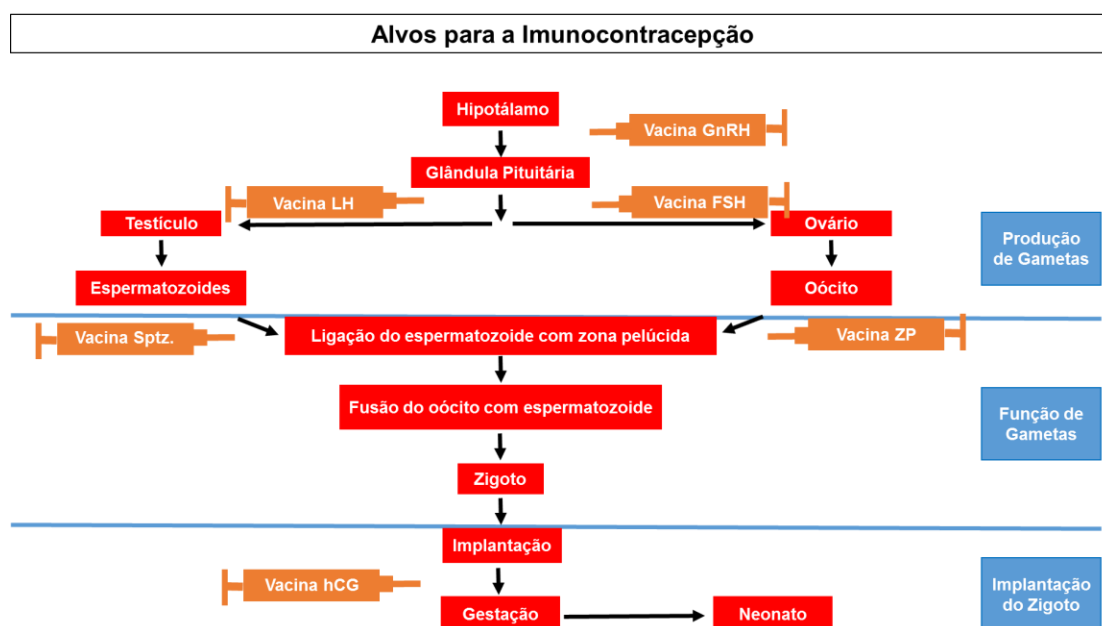


Figura 7 – Esquema demonstrando os vários momentos e alvos que podem ser explorados no desenvolvimento de vacinas contraceptivas.

Por afetarem a produção de esteroides, as vacinas baseadas em GnRH tem aplicação limitada em humanos, que precisariam de suplementação hormonal para manter a libido e características sexuais secundárias (LADD et al., 1998). Em animais, onde este tipo de preocupação é menor, esta forma de vacina tem obtido resultados promissores a curto prazo, (JUNG et al, 2005), embora sua eficácia dependa de diferentes fatores como espécie e homogeneidade genética

da população, limitando o sucesso do procedimento. Ratos e carneiros, por exemplo, apresentaram queda de 30-40% na espermatogênese após a vacinação, enquanto que cães tiveram redução de apenas 5% (FERRO et al, 2004). Da mesma forma, vacinas baseadas em FSH ou em seus receptores, também se mostraram capazes de produzir oligoespermia em macacos (MOUDGAL, DIGHE, 1999), mas sua baixa eficiência em produzir azospermia desencoraja a sua utilização.

Vacinas baseadas em LH e seus receptores, interferem negativamente tanto na produção de gametas quanto esteroides, tendo seus efeitos reversos com a queda da titulação de anticorpos, como demonstrado em cães machos (LADD et al., 1994), cadelas (SAXENA et al., 2002) e gatas (SAXENA et al., 2003). Entretanto os efeitos podem ser permanentes a depender da espécie, como em coelhos machos, onde houve redução da pituitária e atrofia testicular (ARIMURA et al., 1974) ou ainda não produzir anticorpos como no caso de gatos machos (LADD et al., 1994).

Em fêmeas, podem ser utilizadas vacinas baseadas em antígenos da zona pelúcida, que é uma estrutura protetora que envolve o óócito de mamíferos e é responsável pela ligação do espermatozoide ao oócito, pela indução da reação acrossômica no espermatozoide ligado à zona pelúcida e ainda prevenção da polispermia. A zona pelúcida é composta por 3 glicoproteínas: ZP1, ZP2 e ZP3 (WASSARMAN, 1988). Devido a facilidade de encontrar ovários suínos em abatedouros, antígenos provenientes desta espécie são frequentemente utilizados para induzir contracepção em diferentes espécies (GUPTA et al., 2004). Apesar disso, as glicoproteínas da zona pelúcida formam uma barreira preventiva frente a fertilização interespecíes, o que explica a dificuldade de se utilizar, em alguns casos, antígenos de uma espécie em outra, como no caso de gatos. A pequena disponibilidade de ovários de cães e gatos a disposição para se obter e purificar as proteínas da zona pelúcida pode dificultar a implantação desta vacina em pequenos animais, o que pode requerer o uso de vacinas de DNA para expressar os antígenos pretendidos e elucidar a questão (EADE et al, 2009).

Vacinas produzidas contra um antígeno espermático também podem ser usadas em fêmeas, visando provocar a secreção de anticorpos no trato genital

feminino, a fim de se obter contracepção com menor risco de desenvolvimento de uma resposta autoimune (DELVES et al., 2002).

No macho, uma vacina produzida contra um antígeno espermático deve ser capaz de reagir com o espermatozoide pós-testicular. Os anticorpos antiespermatozoides podem entrar no trato genital masculino via *rete testis* e próstata, permitindo o uso de vacinas que inativem os espermatozoides sem danos teciduais (JONES, 1996). O alto número de células espermáticas a serem neutralizadas representam um claro desafio a este método de contracepção em machos (DELVES et al., 2002). Mesmo assim, é sabido que, em casais inférteis humanos, de 2-30% dos parceiros independentemente de sexo possuem anticorpos antiespermatozoides e o mesmo acontece com homens que passaram por vasectomia (LINSKIN et al., 1983; KRAUSE, NAZ, 2009)

Sauber et al. (2002), identificaram a PH-20 (hialuronidase), uma proteína localizada na região da cabeça de células com acrossomo intacto, e que, possivelmente está envolvida no processo de fertilização. Sua função foi relacionada à penetração das células do cumulus e ligação à zona pelúcida, como já descrito em outras espécies (GMACHL et al., 1993, MEYERS et al., 1997). Em cobaias, Primakoff et al. (1988) obtiveram sucesso vacinando machos e fêmeas com a PH-20. Os animais imunizados apresentaram soro com altos títulos de anticorpos anti-PH-20, os quais reconheceram extratos espermáticos e bloquearam *in vitro* a adesão dos espermatozoides à zona pelúcida. Os títulos permaneceram altos por períodos de seis a 15 meses. Apesar das evidências, ainda não há estudos a respeito do potencial contraceptivo da PH-20 na espécie canina.

A proteína recombinante P26h (Surface sperm protein P26h) foi utilizada na imunização de hamsters, resultando em redução do número de fetos viáveis e diminuição do número de espermatozoides ligados à zona pelúcida no teste de ligação espermática em oócitos homólogos. Baseado nestes resultados, concluiu-se que esta proteína tem potencial para ser utilizada como contraceptivo (DUBÉ et al., 2005).

Outro estudo, conduzido em homens férteis e inférteis, identificou imunoreatividade específica contra as proteínas de 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 69 kDa, 72 kDa and 85 kDa no soro e para as proteínas 59 kDa e 72 kDa no plasma

seminal, as quais são as principais envolvidas na resposta imune (PARADISI et al., 1995).

A LDH-C4 (isoforma testicular da L-lactate dehydrogenase) é relacionada a motilidade espermática em várias espécies, sendo uma proteína específica do testículo (GOLDBERG, HERR, 1999). Quatro experimentos utilizando vacinas com estas proteínas em babuínos foram conduzidos, obtendo contracepção reversiva em 63 a 75% dos animais tratados (GOLDBERG, WHEAT, 1981; GOLDBERG, SHELTON, 1986; O'HERN et al., 1997; O'HERN, GOLDBERG, 1993).

Muitas são as opções de antígenos para a produção de vacinas contraceptivas, mas apesar de muitos deles terem gerado resultados positivos em diferentes estudos, sua eficácia ainda é inferior à dos contraceptivos de uso corrente. No entanto, a perspectiva de se encontrar uma vacina eficiente é real, e a concretização desta meta está mais perto a cada pesquisa realizada.

Referências¹

ALEXANDER, N.J., BIALY, G. Contraceptive vaccine development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.6, p.273-80, 1994.

ALMEIDA, I. L. G.; DURFEY, C. L.; GASTAL, G. D. A.; DEVOS-BURNET, D.; WILLARD, S.T.; RYAN, P. L.; FEUGANG, J. M. 134 Relaxin and its receptors in mature canine spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, p.175-175, 2016.

AMORIM, L.; MOURA, V.M.B.D; DI SANTIS, G.W., BANDARRA, E.P.; PADOVANI, C. Serum and urinary measurements of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostatic specific antigen (PSA) in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, p.320-324, 2004.

ANDERSON, N.L.; ANDERSON, N.G. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis**, v.19, p.1853-1861, 1998.

AQUINO-CORTEZ, A.; PINHEIRO, B.Q.; LIMA, D.B.C.; SILVA, H.V.R.; MOTA-FILHO, A.C.; MARTINS, J.A.M.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; MOURA, A.A.; SILVA, L.D.M. Proteomic characterization of canine seminal plasma. **Theriogenology**, v.95, p.178–186, 2017.

¹ Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT 2019

ARIMURA, A., SATO, H., KUMASAKA, T., WOROBEK, R.B., DEBELJUK, L., DUNN, J., SCHALLY, A. V. Production of antiserum to LH-releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH. **Endocrinology**, v.94, 1974, p.1264, 1974.

BARFIELD, J.P., NIESCHLAG, E., COOPER, T.G. Fertility control in wildlife: humans as a model. **Contraception**, v.73, p.6-22, 2006.

BARTHELEMY, C. KHALFOUN, B, GUILLAUMIN, J.M., LECOMTE, P., BARDOS, P. Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. **Journal of reproduction and fertility**, v.82, p. 113-8, 1988.

BEIGLBÖCK, A.; PERA, I; ELLERBROCK, K; KIRCHHOFF, C. Dog epididymis-specific mRNA encoding secretory glutathione peroxidase-like protein. **Journal of reproduction and fertility**. v.112, p.357-67, 1998.

BHAT, K.G., MALHOTRA, P., KARANDE, A.A., ADIGA, P.R. Immunohistochemical localization of riboflavin carrier protein in testicular cells of mammals. **Indian journal of experimental biology**, v.33, p.12–16, 1995.

BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; ARAÚJO, L.R.S.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; QUEVEDO FILHO, I.B.; MOURA, A.A.A.; TONIOLLI, R. O estudo proteômico e o seu potencial de avaliação da fertilidade em machos de diferentes espécies domésticas. **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 3, p. 266-271, 2013.

BARUAH, K.K.; DHALI, A.; BORA, B.; MECH, A.; MONDAL, M. Detection of osteopontin transcript in seminal plasma and its association with post-freeze-thaw quality of cryopreserved spermatozoa in mithun (*Bos frontalis*). **Indian Journal Of Animal Research**, v.51, p.648-653, 2017.

BRANDON; C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-73, 1999.

BUTLER, J.R.A.; DU TOIT, J.T. Diet of free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) in rural Zimbabwe: implications for wild scavengers on the periphery of wildlife reserves. **Animal Conservation**, v.5, p. 29-37, 2002.

BUTLER, J.R.A.; DU TOIT, J.T.; BINGHAM, J. Free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators and prey in rural Zimbabwe: threats of competition and disease to large wild carnivores. **Biological conservation**, v.115, p. 369-378, 2004.

CALVETE, J.; SANZ, L.; REINERT, M.; DOSTALOVA, Z.; TOPFER-PETERSEN, E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 166, p. 515-524, 1995.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bull. **Biology of Reproduction**, v.57,

p.1293-301, 1997.

CASSANI, P.; BECONI, M.T.; O'FLAHERTY, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.163–173, 2005.

CHAPDELAINE, P.; DUBÉ, J.Y.; FRENETTE, G.; TREMBLAY, R.R. Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. **Journal of Andrology**, v.5, p.206-10, 1984.

CHEEMA, R.S.; BHAKRI, G.; GANDOTRA, V.K.; DHANJU, C.K. Characterization of mongrel dog seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. **Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology** (Suppl) v. 2, n. 1, p. 55-63, 2011.

CHEEMA, R.S.; VASHISHT, N.; BHAKRI, G.; GANDOTRA, V.K. Molecular characterization and immunolocalization of sperm surface proteins (SPAM-1 and LDH-C4) in dog. **Animal Science Reporter**, v.7, p.96-106, 2013.

DELVES, P.J.; LUND, T.; ROITT, I.M. Antifertility vaccines. **Trends in Immunology**, v.23, p.213-219, 2002.

DONAVAN, C.; GREER, M.; KUTZLER, M. Physiologic responses following gonadotropin-releasing hormone immunization in intact male dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.403–405, 2012.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; JUSTULIN, L.A.; BEU, C.C.L.; FELISBINO, S.L. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. **Cell Tissue Research**, v.332, p.329–335, 2008).

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

DUBÉ, J. Y. Prostatic kallikreins: biochemistry and physiology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.107c, p.13-20, 1994.

DUBÉ, J.Y.; CHAPDELAINE, P.; TREMBLAY, R.R. Effect of testicular hormones on synthesis of soluble proteins by dog prostate slices. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 61, p.756–763, 1983.

DUBÉ, J.Y., LAZURE, C., TREMBLAY, R.R. Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. **Clinical and investigative medicine**, v.9, p.51-54, 1985.

DUBÉ, E.; LEGARE, C.; GAUDREAU, C.; SULLIVAN, R. Contraceptive responses of female hamsters immunized with recombinant sperm protein P26h. **Contraception**, v. 72, p. 459–467, 2005.

EADE, J.A., ROBERSTON, I.D., JAMES, C.M. Contraceptive potential of porcine and feline zona pellucida A, B and C subunits in domestic cats. **Reproduction**, v.137, p.913-922, 2009.

EL-HAGGAR, S.; RASHED, L.; SALEH, N.Y.; TAYMOUR, M.; MOSTAFA, T. Seminal osteopontin relationship with semen variables in infertile men with varicocele. **Human Andrology**, v. 3, p.90–93, 2013.

ENGLAND, G.C.W., **Dog breeding, whelping and puppy care**. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. p. 340.

ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E., MIDDLETON, D.J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. **Research in Veterinary Science**, v.49, p.66–70, 1990.

ENGLAND, G.C.W., BURGESS, C.M., FREEMAN, S.L., PACEY, A.A. Relationship between the fertile periods and sperm transport in the bitch. **Theriogenology**, v.66, p.1410–1418, 2006.

ENGLAND, G.C.W., RUSSO, M., FREEMAN, S.L. The bitch uterine inflammatory response to mating and its modification by male accessory gland secretion. **The Veterinary Journal**, v.195, p.179–184, 2013.

FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V.; HEIDGER, P.M. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **Journal of reproduction and fertility**. Supplement. V.10, p.105-122, 1970.

FAWCETT, D.W.; NEAVES, W.B.; FLORES, M.N. Comparative observations on the intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v.9, p.500-532, 1973.

FERNANDEZ-NOVELLA, J.M.; BALLESTER, J.; MEDRANO, A.; OTAEGUI, P.J.; RIGAU, T.; GUINOVART, J.J.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. **FEBS Letters**, v.570, p.211–216, 2004.

FORD, W.B.; BELL, W.; KLAUSNER, J.S.; HAYDEN, D.W.; LUND, E.M.; LIEBENSTEIN, B.B.; FEENEY, D.A.; JOHNSTON, S.D.; SHIVERS, J.L.; EWING, C.M.; ISAACS, W.B. Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.9, p.149-153, 1995.

FORESTA, C., MANONI, F., BUSINARO, V., DONADEL, C., INDINO, M., SCANDELLARI, C. Possible significance of transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v.7, p.77-82, 1986.

FERRO, V., KHAN, M.A., MCADAM, D., COLSTON, A., AUGHEY, E., MULLEN, A., WATERSTON, M.M., HARVEY, M.J. Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) - a histological comparison in male animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.73-86, 2004.

FERRO, V.A., MORDINI E. Peptide vaccines in immunocontraception. **Current opinion in molecular therapeutics**, v.6, p.83-89, 2004.

FOOTE, R.H.; SWIERSTRA, E.E.; HUNT, W.L. Spermatogenesis in the Dog. **Anatomical Record**, v.173, p. 341-352, 1972.

FRENETTE, G.; DUBÉ, J. Y.; LACOSTE, D.; TREMBLAY, R.R. Radioimmunoassay in blood plasma of arginine esterase: the major secretory product of dog prostate. **Prostate**, v. 10, p. 145-152, 1987.

FRENETTE, G.; DUBÉ, J.M.Y.; TREMBLAY, R.R. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. **Archives of Andrology**, v.16, p.235-241, 1986.

FRENETTE, G.; DUBÉ, J.Y.; TREMBLAY, R.R. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. **Archives of Andrology**, v.16, p.235-241, 1986.

GADELIA, B.M., COLENBRANDER, B; LOPES-CARDOZO, M. Arylsulfatases Are Present in Seminal Plasma of Several Domestic Mammals. **Biology of Reproduction**, v.45, p.381-386, 1991.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. (Ed.) **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. P.97-110.

GILMONT, R.R.; SENGHER, P.L.; SYLVESTER, S.R.; GRISWOLD, M.D. Seminal Transferrin and Spermatogenic Capability in the Bull. **Biology of reproduction**, v.43, p.151-157, 1990.

GMACHL, M.; SAGAN, S.; KETTER, S.; KRCIL, G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. **FEBS Letters**, v. 336, p. 545-548, 1993.

GOLDBERG, E., HERR, J.C. LDH-C4 as a contraceptive vaccine. In: GUPTA, S.K. (Ed.). **Reproductive immunology**, New Delhi: Narosa, 1999. p.309-315.

GOLDBERG, E., SHELTON, J.A. Immunosuppression of fertility by LDH-C4. In: TALWAR, G.P. (Ed.). **Immunological Approaches to Contraception and Promotion of Fertility**. New York: Plenum Publishing Corporation; 1986; 219-230.

GOLDBERG, E., WHEAT, T.E., POWEL, J.E., STEVENS, V. Reduction of fertility in female baboons immunized with lactate dehydrogenase-C4. **Fertility and Sterility**, v.35, p.214-217, 1981.

GRANDAGE, J. The erect dog penis: a paradox of flexible rigidity. **Veterinary Record**, v.91, p.141–7, 1972.

GUPTA, S.K., SRIVASTAVA, N., CHOUDHURY, S., RATH, A., SIVAPURAPU, N., GAHLAY, G.K., BATRA, D. Update on zona pellucida glycoproteins based contraceptive vaccine. **Journal of Reproductive Immunology**, v.62, p.79–89, 2004.

GUYONNET, B.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L; GATTI, J.L. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. **Journal of Andrology**, v.32, p.651-63, 2011.

HENRY, M.; ECHEVERRI, A.M.L. Maturação e capacitação espermática, reação acrossomica e fertilização. In: __. **Andrologia Veterinária Básica**. Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2013. P.81-95.

HO, H.; SUAREZ, S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, p. 519–526, 2001.

HOLMES, S.D., LIPSHULTZ, L.I., SMITH, R.G. Regulation of transferrin secretion by human Sertoli cells cultured in the presence or absence of human peritubular cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.59, p.1058-62, 1984..

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013**. Rio de Janeiro, 2015.

ISAACS, W.B.; COFFEY, D.S. The predominant protein of canine seminal plasma is an enzyme. **Journal of biology chemistry**, v.259, p.11520-11526, 1984.

ITO, J.; KAWABE, M.; OCHIAI, H.; SUZUKAMO, C.; HARADA, M.; MITSUGI, Y.; SEITA, Y.; KASHIWASAKI, N. Expression and immunodetection of aquaporin 1 (AQP1) in canine spermatozoa. **Cryobiology**, v.57, p.312–314,2008.

JERVIS, K.M.; ROBAIRE, B. Dynamic Changes in Gene Expression along the Rat Epididymis. **Biology of Reproduction**. v. 65, p. 696-703, 2001.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v.48, p.1199-1216, 1997.

JOHNSTON, S.D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 21, p. 545-51, 1991.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRIZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: Saunders. 2001. 592 p.

JONES, R.C.; MURDOCH, R.N. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 553–568, 1996.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538 p.

KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; TAKANO, M.; HIRANO, T.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic beagles. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, p.133–136, 2007.

KIKUCHI, M.; MIZOROKI, S.; KUBO, T.; OHWA, 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.

KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-7, 1993.

KIRKPATRICK, J.F.; LUDA, R.O.; FRANK, K.M. Contraceptive vaccines for wildlife: a review. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.66, p.40-50, 2011.

KRAUSE, W.K.H., NAZ, R.K. (Eds): **Immune Infertility**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 2009; pp. 1–236.

KUTZLER, M.A. Semen collection in the dog. **Theriogenology**, v.64, p.747–754, 2005.

LADD, A., PRABHU, G., TSONG, Y.Y., PROBST, T., CHUNG, W., THAU, R.B. Active immunization against gonadotropin-releasing hormone combined with na complementary androgen supplementation is a promising antifertility vaccine for males. **American journal of reproductive immunology and microbiology**, v.17, p.121-7, 1998.

LADD, A., TSONG, Y.Y., WALFIELD, A.M., THAU, R. Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. **Biology of reproduction**, v.51, p.1076-1083, 1994.

LISKIN L., PILE, J.M., QUILLAN, W.F. Vasectomy safe and simple. **Population Reports**, v.4, p.61–100, 1983.

Li, T. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biology of reproduction**, v.12, p.641-646, 1975.

LIMA, A.F.M.; PARDINI, L.; LUNA, S.P.L. Avaliação de sobrevivência, alterações genitourinárias, comportamentais e de peso corpóreo no pós-operatório tardio em cadelas e gatas submetidas a ovariosalpingohisterectomia sob diferentes métodos de ligadura do pedículo ovariano. **ARS Veterinária**, v.26, p.60-65, 2010.

LESSA, I.; GUIMARÃES, T.C.S.; BERGALLO, H. G.; CUNHA, A.; VIEIRA, E.M. Domestic dogs in protected areas: a threat to Brazilian mammals? **Brazilian Journal of Nature Conservation**, v.14, p.46–56, 2016.

MANJUNATH, P., THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-19, 2002.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade na função testicular de cães**. 2005. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária [Botucatu]), Universidade Estadual Paulista Júlio, UNESP, Botucatu.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Eletroforese das proteínas do fluido epididimal canino: Dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 72-75, 2002.

McENTEE, M.; ISAACS, W.; SMITH, C. Adenocarcinoma of the canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. **Prostate**, v. 11, p. 163-170, 1987.

MEEUSEN, E. N. T.; WALKER, J.; PETERS, A.; PASTORET, P.; JUNGENSEN, G. Current status of veterinary vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 489–510, 2007.

MEYERS, S. A.; YUDIN, A. I.; CHERR, G. N.; VANDE VOORT, C. A.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P.; OVERSTREET, J. W. Hyaluronidase activity of macaque sperm assessed by an in vitro cumulus penetration assay. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 392-400, 1997.

MOGIELNICKA-BRZozowska, M.; DZIEKOŃSKA, A.; STRZEŻEK, R.; ZAŁĘCKI, M.; MAJEWSKA, A.; TOŁŚCIK, K.; KORDAN, W. Effect of seminal plasma zinc-binding proteins on motility and membrane integrity of canine spermatozoa stored at 5°C. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.58, p.163-168, 2014.

MOGIELNICKA-BRZozowska, M.; FRASER, L.; CZARZASTA, J.; KORDAN, W. Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 3, p. 493-498, 2012.

MOUDGAL, N.R., DIGHE, R.R. Is FSH-based contraceptive vaccine a feasible proposition for the human male? In: GUPTA, S.K, (Ed). **Reproductive immunology**. New Delhi: Narosa Press, 1999, p.346-57.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.25, p.747–806, 2004.

MURTY, C.V.R., ADIGA, P.R. Pregnancy suppression by active immunization against gestation-specific riboflavin carrier protein. **Science**, v.216, p.191–193, 1982.

NASS, S.J., STRAUSS, J.F. Strategies to facilitate the development of new contraceptives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p.885-890, 2004.

NATOLI, E.; MARAGLIANO, L.; CARIOLA, G.; FAINI, A.; BONANNI, R.; CAFFAZZO, S.; FANTINI, C. Management of feral domestic cats in the urban environment of Rome (Italy). **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p. 180–185, 2006.

NAZ, R. K. Antisperm contraceptive vaccines: where we are and where we are going? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, n. 1, p. 5-12, 2011a.

NAZ, R.K. Contraceptive vaccines: success, status, and future perspective. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.66, p.2- 4, 2011b.

NAZ, R.K. Contraceptive Vaccines. **Drugs**, v.65, p.593-603, 2005.

O'HERN, P.A., GOLDBERG, E. Development of a contraceptive peptide vaccine for use with PGAL microspheres. In: **Proceedings of the international symposium on controlled release of bioactive materials**, Controlled Release Society, 1993, p.394-395.

O'HERN, P.A., LIANG, Z.G., BAMBRA, C.S., GOLDBERG, E. Colinear synthesis of an antigenspecific B-cell epitope with a "promiscuous" tetanus toxin T-cell epitope: a synthetic peptide immunocontraceptive. **Vaccine**, v.35, p.1761-1766, 1997.

PALMER, C.; PEDERSEN, H.G.; SANDOE, P. Beyond castration and culling: should we use non-surgical pharmacological methods to control the sexual behavior and reproduction of animals? **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v.31, p.197–218, 2018.

PARADISI, R.; PESSION, A.; BELLAVIA, E.; FOCACCI, M.; FLAMIGNI, C. Characterization of human sperm antigens reacting with antisperm antibodies from autologous sera and seminal plasma in a fertile population. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 28, p. 61-73, 1995.

PERO, M.E.; KILLIAN, G.J.; LOMBARDI, P.; ZICARELLI, L.; AVALLONE, L.; GASPARRINI, B. Identification of osteopontin in water buffalo semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.279, 2006.

PRIMAKOFF, P.; LATHROP, W.; BRONSON, R. Identification of human sperm surface glycoproteins recognized by autoantisera from immune infertile men, women, and vasectomized men. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 929–942, 1990.

PRIMAKOFF, P.; LATHROP, W.; WOOLMAN, L.; COWAN, A.; MYLES, D. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. **Nature**, v. 335, p. 543-546, 1988.

RAHME, L.S.T.R.; HENRY, M. Anatomia do espermatozoide e fisiologia do movimento. In: HENRY, M.; ECHEVERRI, A.M.L. **Andrologia Veterinária Básica**. Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2013. P.73-79.

REECE, J.F.; CHAWLA, S.K.; HIBY, E.F.; HIBY, L.R. Fecundity and longevity of roaming dogs in Jaipur, India. **BMC Veterinary Research**, v.4, p1-7, 2008.

REESE, J.F. Dogs and dog control in developing countries. In: D.J. Salem & A.N. Rowan (Eds.). **The state of the animals III**. Washington, DC: Humane Society Press, p. 55-64, 2005.

SABEUR, K.; FORISTALL, K.; BALL, B.A. Characterization of PH-20 in canine spermatozoa and testis. **Theriogenology**, v.57, p.977-987, 2002

SAENGSOI, W.; SHIA, W.Y.; SHYU, C.L.; WU, J.T.; WARINRAK, C.; LEE, W.M.; CHENG, F.P. Detection of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in canine seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.114–119, 2011.

SAUBER, K.; FORISTALL, K.; BALL, B.A. Characterization of PH-20 in canine spermatozoa and testis. **Theriogenology**, v.57, p. 977-987, 2002.

SAXENA, B.B., CLAVIO, A., SINGH, M., RATHNAM, P., BUKHAROVICH, Y., REIMERS, T., SAXENA, A., PERKINS, S. Modulation of ovarian function in female dogs immunized with bovine luteinizing hormone receptor. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.9–17, 2002.

SAXENA, B.B., CLAVIO, A., SINGH, M., RATHNAM, P., BUKHAROVICH, E.Y., REIMERS, T.J., SAXENA, A., PERKINS, S. Effect of immunization with bovine luteinizing hormone receptor on ovarian function in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, p.292–298, 2003.

SCHILLER, J. Immunological approaches to sterilization of cats and dogs. In: 4th International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control, Alliance for Contraception in Cats & Dogs - ACCD, Dallas, Texas, USA. **Proceedings ...**, 2010. p.1-9.

SESGHAGIRI, P.B., ADIGA, P.R. Pregnancy suppression in the bonnet monkey by active immunization with the chicken riboflavin carrier protein. **Journal of Reproductive Immunology**, v.12, p.93–107, 1987.

SINOWATZ, F.; FISCHER, M.; SKOLEK-WINNISCHT, R.; CHANDLER, J.A. Histochemical localization of glycosidases in dog epididymis. **Histochemical Journal**, v.11, p.103-109, 1979.

SKINNER, M.K., GRISWOLD, M.D. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.9523-5, 1980.

SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.; MONACO, E.; KILLIAN, G.J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.72-89, 2008.

SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise**

bioquímica do plasma seminal canino (Electrophoretical characterization of protein profile and biochemistry analysis of canine seminal plasma). Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, Brazil, 98p, 2003.

SOUZA, F.F.; BARRETO, C.S.; LOPES, M.D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. **Theriogenology**, v. 68, p. 100–106, 2007.

SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.; LOPES, M.D. Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, Supplement 2, p.283–286, 2009.

SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; LOPES, M.D. Correlation of canine seminal plasma and sperm membrane proteins with seminal parameters and in vitro fertility. In: **Proceedings of the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress**, 2008 - Vienna, Austria. p. 1-2.

SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Massa molar das proteínas do plasma seminal canino: dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 75-77, 2002.

SOUZA, F.F.; MARTINS, M.I.M.; FERNANDES, C.E.S.; RIBOLLA, P.E.M.; LOPES, M.D. Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. **Theriogenology**, v. 66, p. 1606–1609, 2006.

SRIDHAR, L.; KUMAR, M., ADIGA, P.R. Active immunization with riboflavin carrier protein suppresses fertility in male rodents and monkeys. In: **Discussion Meeting on Perspectives in Biochemistry and Molecular Biology**. [Abstracts] Indian Institute of Science, Bangalore, India. p. 334. 1996.

STOREY, B.T., KAYNE, F.J. Properties of pyruvate kinase and flagellar ATPase in rabbit spermatozoa: Relation to metabolic strategy of the sperm cell. **Journal of Experimental Zoology**, v.211, p.361–367, 1980.

SUAREZ, S.S.; OSMAN, R.A. Initiation of Hyperactivated Flagellar Bending in Mouse Sperm within the Female Reproductive Tract. **Biology of Reproduction**, v.36, p. 1191-1198, 1987.

SURI, A. Contraceptive vaccines targeting sperm. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 5, n. 3, p. 381-392, 2005.

SURI, A. Family of sperm associated antigens: relevance in sperm-egg interaction and immunocontraception. **Society for Reproduction and Fertility**, v. 63, p. 433-443, 2007.

TOPFER-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.

TORRES, J. L.; PALOMINO, J.; MORENO, R. D.; DE LOS REYES, M. Pannexin channels increase propidium iodide permeability in frozen-thawed dog spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, p.2269-2276, 2017.

TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction, fertility and development**, v.18, p. 25-38, 2006.

TURNER, R.M. Tales From the Tail: What Do We Really Know About Sperm Motility? **Journal of Andrology**, vol. 24, p.790-803, 2003.

TURNER, T.T. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. **Annals New York Academy of Sciences**. v. 637, p. 364-83. 1991.

WAHEED, M.M.; EL-BAHR, S.M.; AL-HAIDER, A.K. influence of seminal plasma antioxidants and osteopontin on fertility of the arabian horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.705-709, 2013.

WASSARMAN, P.M. Zona pelúcida glycoproteins. **Annual Review of Biochemistry**, v.57, p.415-42,1988.

WOLFSBERG, T.G.; WHITE, J.M. ADAMs in Fertilization and Development. **Developmental biology**, v.180, p. 389-401, 1996.

ZOU, Y., YANG, J., CHANG, S., XU, W., YIN, T., & LONG, W. Acetyl-L-carnitine: an effective antioxidant against cryo-damage on human spermatozoa with asthenospermia. **Current Medical Science**, v.37, p.915–921, 2017.