

IGF-I, leptina, insulina e proteínas associadas à qualidade do plasma seminal: ação local

Fernando Andrade Souza* / Jorge André Matias Martins** / Jair Perez Osorio*** / Vicente Ribeiro do Vale Filho**** / Venicio José de Andrade***** / Abisai D`Oliveira-Sousa***** / Felipe Albano do Carmo Patrício***** / Liliana Chacón Jaramillo*****

RESUMO

É possível que a expressividade de alguns elementos do plasma seminal dos bovinos, como proteínas e hormônios, possa servir como marcadores para sêmen de alta ou baixa fertilidade. Vários estudos têm demonstrado a associação de proteínas do plasma seminal com a fertilidade de touros. Dentre as mais estudadas, destacam-se aquelas com afinidade à heparina, que exercem importantes papéis na capacitação espermática e na reação acrossômica. Alguns fatores endócrinos e/ou locais, podem estar associados à expressividade e/ou função destas proteínas, auxiliando nas condições espermáticas favoráveis à fecundação. Dentre estes, destacam-se a insulina, a leptina e o fa-

tor de crescimento semelhante à insulina do tipo I. Assim sendo, evidenciam diferenças entre animais, estando associados à estrutura e as condições metabólicas da célula espermática, auxiliando na determinação da qualidade do plasma seminal. Desta maneira, o estudo das proteínas do plasma seminal associado à condição metabólica destes hormônios, presentes neste meio, pode servir como importante parâmetro de avaliação da condição reprodutiva do macho.

Palavras chave: puberdade, BSP, HBP, insulina, IGF-I, leptina.

* Médico veterinário, doutorando em Ciência Animal. Bolsista CAPES-UFMG. Correo electrónico: femedvet@yahoo.com.br

** Médico veterinário, Doutor. Bolsa DCR-UFC. Correo electrónico: jammvet@gmail.com

*** Médico veterinário, Ph.D. Professor titular do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias-UFMG. Correo electrónico: jair_ufmg@yahoo.com.br

**** Médico veterinário, Ph.D. Professor associado do Departamento de Zootecnia-UFMG. Correo electrónico: vicdovale@uol.com.br

***** Médico veterinário, Doutor. Professor adjunto III-UEMA. Correo electrónico: dr_oliv_usa@hotmail.com

***** Médico veterinário, M.Sc., Ph.D. em Fisiologia da Reprodução. Professor associado Universidad de La Salle, Bogotá (Colombia). Correo electrónico: lchacon@unisalle.edu.co

Fecha de recepción: mayo 19 de 2010

Fecha de aprobación: septiembre 13 de 2010

IGF-I, LEPTINE, INSULIN AND PROTEINS ASSOCIATED TO SEMINAL PLASMA QUALITY: LOCAL ACTION

ABSTRACT

It is possible that the expression of some elements in seminal plasma, such as proteins and hormones, may act as markers of quality. Several studies have demonstrated an association of seminal plasma proteins with fertility. Among the most studied, there are the proteins with affinity to heparin, which play an important role in sperm capacitation and acrosome reaction. Some endocrine factors and/or locals may be associated with the expression and function of these proteins, aiding in sperm condition conducive to fertilization. Among them stand out as insulin,

leptin and growth factor insulin-like type I. These factors may highlight the differences between these animals because they are associated with the metabolic condition and structure of sperm cells, aiding in determining the quality of seminal plasma. Thus, the study of seminal plasma proteins associated with the metabolic condition of these hormones are present in this medium can serve as a new parameter for assessment of male reproductive condition.

Keywords: puberty, BSP, BPH, insulin, IGF-I, leptin.

INTRODUÇÃO

O plasma seminal é um fluido com papel essencial para as funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação até a fecundação (Kraus *et ál.*, 2005). Durante o transporte, através do epidídimo, e na ejaculação, os espermatozoides adquirem várias proteínas oriundas do fluido epididimário e das secreções das glândulas acessórias, além de terem contato também com hormônios produzidos, principalmente, nos testículos (Yanagimachi, 1994).

As proteínas são os constituintes orgânicos encontrados em maior quantidade neste meio. Contudo, o plasma seminal também apresenta sais minerais e hormônios que atuam juntamente a estas proteínas, tendo importantes funções fisiológicas sobre as células espermáticas (Jelínková *et ál.*, 2003). Dentre as proteínas encontradas no plasma seminal, destacam-se as com afinidade à heparina, que possuem ação na capacitação espermática e na reação acrossômica (Killian *et ál.*, 1993). Já entre os hormônios presentes neste meio, destacam-se a leptina, a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), por apresentarem papel primordial na estrutura e motilidade espermática, favorecendo à fecundação (Ahima *et ál.*, 2000; Tena-Sempere e Barreiro, 2002).

Bellin *et ál.* (1998) e Gnessi *et ál.* (1997) ressaltaram a importância desses elementos sobre a qualidade da célula espermática, podendo interferir tanto positiva quanto negativamente na fertilidade, sendo possível que a expressão de algum desses produtos, neste meio, possam servir como marcadores para a fertilidade por evidenciar, primariamente, a qualidade do fluido seminal.

Desta forma, objetivou-se com esta revisão de literatura ressaltar os principais pontos envolvidos na qualidade da célula espermática, associados à presença de proteínas e de alguns hormônios metabóli-

cos como leptina, insulina e IGF-I, também presentes no plasma seminal.

AÇÃO DA LEPTINA NOS TESTÍCULOS DIMINUINDO A CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA E A QUALIDADE DA CÉLULA ESPERMÁTICA T2

O produto do gene da obesidade, a leptina, é um hormônio plasmático secretado pelos adipócitos que exerce papel chave na regulação da ingestão de alimentos, gasto de energia e homeostase do peso corporal (Friedman e Halaas 1998). A leptina foi originalmente proposta como sendo sinalizadora de alça longa do tecido adiposo com o núcleo hipotalâmico na regulação da ingestão de alimento em longo prazo. Subsequentes pesquisas têm amplamente validado esta hipótese, provindo fortes evidências que a leptina pode alterar a ingestão de energia por modular a produção hipotalâmica de peptídeos orexigênicos (NPY e AGRP) e anorexigênicos (POMC e CART). Contudo, os papéis propostos para a leptina agora tem se expandido para a regulação do metabolismo, crescimento e reprodução (Bradford *et ál.*, 2006).

Evidências indicam que o hipotálamo é o alvo primário para a maioria das ações deste hormônio sobre o eixo reprodutivo. Contudo, baseado sobre a caracterização da distribuição dos receptores e efeitos da leptina em sistema *in vivo*, locais adicionais para a ação do receptor deste hormônio têm sido sugeridos, incluindo a hipófise, os testículos e os ovários (Tena-Sempere *et ál.*, 1999).

Existe uma diferença, dependente do sexo, na concentração plasmática de leptina e na sua expressão de RNAm (Luukkaa *et ál.*, 1998). Essa diferença não se mostra simplesmente explicada pela diferença na quantidade de gordura corporal entre os sexos. Enquanto fêmeas *ob/ob* (nulas para leptina) são invariavelmente inférteis, um limitado número de machos

ob/ob tem sido reportado ter desenvolvimento reprodutivo normal. Isto sugere que, embora a leptina participe no controle da função reprodutiva tanto em machos quanto em fêmeas, diferenças sexuais podem existir na extensão fisiológica deste controle. Consequentemente nota-se que os esteróides sexuais modulam a expressão e a secreção de leptina de maneira oposta: o estrógeno estimula a liberação de leptina pelos adipócitos *in vitro*, enquanto os andrógenos diminuem a expressão gênica e a secreção da mesma (Tena-Sempere e Barreiro, 2002).

Uma correlação negativa entre os níveis de testosterona e leptina tem sido descrita em humanos, sendo atribuída ao efeito direto dos andrógenos na secreção de leptina pelos adipócitos (Tena-Sempere e Barreiro, 2002), como constatado por Luukkaa *et ál.* (1998) que trabalharam com homens acima de 70 anos de idade. Este mesmo grupo, trabalhando com homens de 31 anos de idade, demonstrou que a administração de testosterona, 200 mg semanalmente, diminuiu a concentração de leptina sérica do pré-tratamento, $3,4 \pm 1,4 \mu\text{g/L}$, para $1,9 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$, durante o tratamento. Sendo que os valores de antes do tratamento foram restabelecidos após a retirada da suplementação com testosterona.

No entanto, a ação da leptina sobre a testosterona não ocorre somente de forma sistêmica, sendo constatada ação entre estes dois hormônios nos testículos. Pois, a avaliação do efeito testicular direto da leptina revela sua habilidade para inibir a secreção de testosterona, resposta análoga a observada em termos de esteroidogênese ovariana após estimulação pela leptina *in vitro* (Tena-Sempere *et ál.*, 1999). Desta forma, especula-se que exista um complexo modo de ação da leptina em múltiplos locais do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que envolve tanto a resposta estimulatória quanto a inibitória (Tena-Sempere *et ál.*, 2001).

As ações biológicas da leptina são executadas através de seus receptores de superfície específicos. O receptor de leptina (Ob-R) pertence à superfamília das citocinas que contem um domínio simples. A expressão do gene Ob-R resulta em uma ordem de isoformas alternativamente divididas (Ob-Ra a Ob-Rf), compartilhando o domínio extracelular, mas diferenciando nas regiões transmembrana/citoplasmática. Neste cenário, é provável que a regulação da ação da leptina sobre os tecidos alvos possam depender, pelo menos parcialmente, do balanço da expressão das diferentes isoformas do Ob-R (Tena-Sempere *et ál.*, 2001).

Caprio *et ál.* (2003) investigaram o desenvolvimento da expressão do Ob-R nos testículos de ratos desde o início da gestação até a idade adulta e encontraram um padrão peculiar da expressão do Ob-R nas células de Leydig. Nos testículos, o Ob-R imunorreativo esteve presente na vida embrionária tardia, sendo ausente na vida pré-puberal e aparecendo novamente na idade adulta. O padrão de desenvolvimento do Ob-R nos testículos foi diferente do observado no hipotálamo, aonde este receptor foi constantemente evidente durante todo o desenvolvimento.

Ruiz-Cortes e Olivera-Angel (2009), trabalhando com touros do período pré-puberal até o início da puberdade demonstraram haver correlação negativa entre leptina e testosterona ($r = 0,33; p < 0,05$). Isto sugere um possível efeito da leptina nos testículos no início da puberdade. A correlação entre as isoformas Ob-R e a associação com os níveis de testosterona e leptina sugerem a possível interação entre leptina e testosterona via regulação da expressão dos receptores. Porém, novas pesquisas sobre os caminhos moleculares precisam ser realizadas para se compreender melhor os mecanismos envolvidos nestas vias.

De fato, enquanto a leptina inibe a produção de testosterona induzida por gonadotropina coriônica humana (hCG) e amplifica a produção de AMPc in-

tracelular estimulada por esta gonadotropina pelas células de Leydig em adultos, não modifica a esteroidogênese ou a produção de AMPc pelas células de Leydig pré-puberais (Caprio *et ál.*, 2003). Contudo, deve-se observar que a biossíntese dos hormônios esteroidais testiculares é um processo hormonalmente regulado por múltiplos passos que envolvem a conversão sequencial de colesterol em testosterona por ações coordenadas de um grupo de citocromo P450 hidroxilase e a enzima hidroxisteróide desidrogenase. O primeiro e limitante passo desta cascata é a translocação do colesterol para a membrana interna mitocondrial e sua subsequente conversão em pregnenolona, eventos que são mediados pela proteína esteroidogênica aguda regulatória (StAR) e a enzima de clivagem da cadeia ramificada do colesterol citocromo P450 (P450), respectivamente (Miller, 1988).

Desta forma, especula-se que os mecanismos pelos quais a leptina inibe a secreção de testosterona podem envolver, pelo menos, a modulação dos eventos iniciais no caminho da esteroidogênese. Isto é suportado pelo decréscimo induzido pela leptina, de maneira dose dependente, dos níveis de RNAm da StAR observado nas mesmas amostras (Tena-Sempere *et ál.*, 2001). Dado que a regulação da esteroidogênese pelos vários sinais hormonais é firmemente correlacionada com as mudanças na expressão gênica de StAR, Tena-Sempere *et ál.* (2001) sugeriram que o decréscimo na expressão gênica desta enzima, induzido pela leptina, pode contribuir para a inibição da secreção de testosterona *in vitro*, abrindo a possibilidade que a expressão desta enzima possa estar sob a regulação da leptina em outros tecidos esteroidogênicos.

Neste contexto, o grupo de pesquisa de Tena-Sempere e Barreiro (2002) avaliou o efeito da leptina na secreção de testosterona testicular *in vitro*. A incubação de tecidos testiculares de ratos púberes (30 dias de idade) e adultos (70 dias de idade) com aumento na concentração de leptina recombinante foi realizada

tanto nas condições basais quanto com estimulação de gonadotropina coriônica humana (hCG). Neste cenário, a leptina foi capaz de inibir a secreção basal e estimulada de testosterona nas amostras testiculares de ratos adultos, mas não foi efetiva nas amostras de ratos púberes. Contudo, tem de ser considerado, que os testículos de animais púberes produzem mais andrógenos 5-alfa reduzidos do que testosterona, este fenômeno pode contribuir para a falta do efeito da leptina observado neste estágio.

Além do envolvimento com as concentrações de testosterona, a leptina do plasma seminal foi também negativamente associada com a percentagem de espermatozóides móveis e com a velocidade linear. Isto pode indicar um envolvimento no mecanismo do desenvolvimento da motilidade. Em contraste, a leptina sérica não mostra nenhuma relação com os parâmetros do espermograma. A concentração de leptina entre amostras de sêmen, normal e patológica, diferiu significativamente ($p < 0,05$), apesar de não haver diferença significativa no índice de massa corporal entre os grupos (Glander *et ál.*, 2002).

Estes achados são compatíveis com o papel periférico da leptina, como sugerido por Tena-Sempere *et ál.* (1999) que demonstraram inibição da secreção de testosterona em testículo de ratos adultos, *in vitro*. Resultados semelhantes foram apresentados por Sih *et ál.* (1997) aonde observaram a normalização dos níveis elevados de leptina plasmática em homens hipogonadais depois da suplementação com testosterona.

A detecção de leptina no plasma seminal de homens vasectomizados, tão bem como dentro dos túbulos seminíferos, sugerem uma existência multilocular para a leptina no trato reprodutivo do macho. Os espermatozóides podem, assim, entrar em estreito contacto com a leptina, podendo ser afetados quanto ao desenvolvimento da motilidade. Indicando com isto mais um efeito negativo da leptina sobre a função

gonadal. Pois, o efeito inibitório da leptina sobre a secreção de testosterona testicular pode exercer papel no decréscimo da motilidade espermática (Glander *et ál.*, 2002).

No entanto, apesar dos dados relatados acima, Caprio *et ál.* (2003) não detectaram receptores para leptina nos túbulos, células de Sertoli ou células germinativas de ratos. Indicando que a presença de receptores de leptina nos testículos pode ser apresentada de forma espécie-específica, devendo-se sempre observar qual espécie está sendo trabalhada para se realizar ponderações quanto às respostas obtidas frente aos valores da leptina ganadal.

INSULINA NO PLASMA SEMINAL E A QUALIDADE ESPERMÁTICA

A insulina é um hormônio anabólico que promove a captação de glicose e aminoácidos, a síntese de proteínas e lipídeos e o aumento das funções intracelulares e da membrana plasmática. É uma proteína formada por duas cadeias (α e β), com 21 e 30 aminoácidos, respectivamente, conectadas por duas pontes dissulfeto. Embora haja alguma diferença na composição dos aminoácidos entre espécies, elas são pequenas. Como resultado, a atividade da insulina não é espécie-específica (Abdelmonein *et ál.*, 1998).

A insulina é importante para a promoção e regulação do crescimento, diferenciação e metabolismo celular. Em mamíferos adultos, considera-se que a insulina seja produzida somente nas células β do pâncreas. Contudo, ela tem mostrado exercer papel central na regulação da função gonadal (Aquila *et ál.*, 2005). Pois, segundo Nakayama *et ál.* (1999), a insulina promove a diferenciação das espermatogônias em espermatócito primário pela ligação com os receptores de IGF-I. Sendo que ambas, membrana plasmática e acrossomal, representam alvos citológicos para a mesma.

Contudo, além de agir na condição da membrana plasmática do espermatozóide, considera-se que a insulina também aja no seu metabolismo. Pois, a energia utilizada pelo espermatozóide para iniciar os processos catabólicos e manter a motilidade, o balanço iônico e várias funções celulares vem através da glicólise. A motilidade espermática é um evento dependente desse processo, pois aproximadamente 90% do ATP são produzidos por esta via em espermatozoides maduros. Além disso, as enzimas glicolíticas estão concentradas na peça principal, produzindo ATP adjacente ao sítio em que é requerido para manter a atividade flagelar (Van Tilburg *et ál.*, 2008).

O espermatozóide conta primariamente com 90% de substratos extracelulares para satisfazer sua energia requerida. Eles metabolizam facilmente monossacarídeos, mas não metabolizam outros açúcares ou carboidratos complexos. Sendo que esses açúcares não penetram tão prontamente nas membranas celulares, necessitando da presença de insulina para a movimentação da glicose através da membrana plasmática, induzindo o aumento do número de proteínas transportadoras específicas (Cunningham, 1997).

Andò e Aquila (2005) e Aquila *et ál.* (2005) demonstraram que a insulina liberada pelo espermatozóide no ejaculado auto-regula a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enzima limitante na via da pentose fosfato (PPP), que tem se mostrado ser crucial na aquisição da capacidade fecundante e na motilidade espermática, tão bem como na mediação da fusão dos gametas.

Confirmando estas ações da insulina, Aquila *et ál.* (2005) demonstraram, por análise imunocitoquímica, um padrão de expressão heterogêneo da insulina, implicando em diferentes graus de condição energética entre os espermatozoides. Na maioria das células espermáticas em amostras não capacitadas, a insulina foi localizada no nível subacrossomal, na peça

intermediária e ao longo de toda a cauda. Contudo, uma diminuição global e distribuição uniforme da intensidade do sinal de insulina foram observadas em espermatozoides capacitados, sugerindo um possível envolvimento da insulina na indução da capacitação.

Frente a essas observações, van Tilburg *et ál.* (2008), determinaram que a baixa concentração de insulina em meios diluidores para congelamento de sêmen é associada com maior número de células espermáticas capacitadas. Sugerindo que durante o processamento do sêmen, quando o mesmo é diluído, a concentração de insulina presente no plasma seminal também é diluída, podendo ativar mecanismos que acarretem na capacitação precoce. Desta forma, estes autores colocam a insulina como fator de preservação do estado não capacitado. Sugerindo que quando as células espermáticas entram em contato com os fluidos do trato reprodutivo da fêmea, maior quantidade de insulina é liberada em resposta a maior concentração de glicose neste ambiente.

Outra hipótese, segundo revisão de Van Tilburg *et ál.* (2008), para justificar a ação da insulina em preservar a integridade acrossômica seria através do mecanismo que ocorre em alguns tipos celulares, como nas células hepáticas, em que a insulina inibe a ligação do AMPc à proteína quinase A (PKA) e, conseqüentemente, a sua ativação, demonstrando que a insulina pode diminuir a afinidade da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) com o AMPc, baseado na especificidade da insulina em antagonizar essa ligação, e com isso reduzir a atividade capacitante da célula espermática.

A capacidade autônoma de o espermatozoide liberar insulina sugere que ele, através de um circuito de alça curta autócrina, pode fornecer o recrutamento de substratos energéticos, de acordo com as suas necessidades metabólicas. Isso ocorre independentemente da regulação sistêmica e pode representar um

mecanismo de proteção que preserva a capacidade de fecundação da célula espermática por eventuais efeitos nocivos produzidos pela longa restrição calórica ou por alterações que ocorrem na homeostase energética a nível sistêmico (Andò e Aquila, 2005).

A insulina também interfere na condição estrutural da célula espermática. Resultados do exame realizado por microscopia eletrônica de transmissão em pacientes diabéticos demonstraram que estes apresentaram vários defeitos estruturais. Em particular, defeitos relacionados com a imaturidade e apoptose foram reconhecidos, destacando-se as alterações no acrossoma, no núcleo, na mitocôndria e na membrana plasmática. Estes resultados indicam um papel da insulina e do metabolismo de carboidratos na espermatogênese. Um sutil impedimento crônico da secreção de gonadotropina pode, pelo menos em parte, ser responsável pela espermatogênese defeituosa. Contudo, a redução na resposta do LH e FSH à administração de GnRH é pequena para ser considerada como evento primário na causa dos distúrbios da estrutura espermática (Baccetti *et ál.*, 2002). Porém, a insulina por estimular a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, e por aumentar as funções intracelulares e da membrana plasmática, pode ser responsável pela melhora da sobrevivência espermática (Abdelmonein *et ál.*, 1998).

AÇÃO DO IGF-I NA QUALIDADE SEMINAL

Levando em consideração o ambiente testicular, assumisse haver uma rede intratesticular de reguladores, requintadamente cronometrada e regionalizada, que pode participar primeiro no desenvolvimento da gônada e mais tarde na iniciação e manutenção da função testicular. Podendo, em parte, responder pela qualidade seminal. Contudo, ao invés da dependência total do clássico controle hormonal intracelular, estes fatores reguladores envolvem comunicações inter, intra e celular ambiental favorecendo uma melhor interação entre os mesmos (Gnessi *et ál.*, 1997).

Segundo Ritzen (1983) uma comunicação parácrina entre as células de Sertoli e as células germinativas nos estádios iniciais de diferenciação via IGF-I é muito provável de ocorrer. Os receptores de ligação para IGF-I são localizados sobre as células de Leydig, Sertoli, espermátócitos e espermátides. Sendo que o IGF-I testicular é produzido principalmente pelas células de Sertoli por estimulação do FSH (Ritzen, 1983; Jones e Clemmons, 1995).

A produção de IGF-I pela cultura das células de Sertoli e Leydig sugere que o IGF-I pode atuar como um fator de desenvolvimento e diferenciação para a espermatogônia, espermátócito e espermátide. A expressão dos ligantes de IGF-I e -II pelas células de Sertoli e Leydig e a identificação de seus receptores sobre estas células e sobre espermatogônias, espermátócitos e espermátides indica que estes fatores de crescimento são reguladores da função testicular (Henricks *et al.*, 1998).

Além disso, Henricks *et al.* (1998) avaliaram a presença de IGF no plasma seminal de bovinos e determinaram a expressão de receptores de IGF-I nos espermatozoides ejaculados e sua ação sobre a motilidade espermática. Estes autores demonstraram que o IGF-I pode interagir diretamente com o seu receptor presente no espermatozoide. Esta interação de ligantes e receptores pode aumentar a motilidade e a velocidade linear da célula espermática, sugerindo que o IGF-I, possivelmente, possui papel regulatório nos eventos da pré-fecundação, como demonstrado pelo trabalho de Colombo e Naz (1999) que constatou diferença significativa na concentração de IGF-I total no plasma seminal humano entre grupos de homens férteis e imunoinférteis.

O IGF-I no plasma seminal pode também ter função regulatória no pós-ejaculado, afetando a capacitação espermática através de uma série de mudanças fisiológicas, como: mudança de íons intracelular, na

fluidez da membrana plasmática e no metabolismo da célula espermática (Sánchez-Luengo *et al.*, 2005). No entanto, esse papel do IGF-I é regulado por suas proteínas ligadoras (IGFBPs) que limitam sua disponibilidade no plasma seminal.

Miao *et al.* (1998) demonstraram que a superexpressão de IGF-I nos testículos induz o aumento da IGFBP no plasma seminal causando a inibição da sua atividade. Isto, em parte, confirma a existência de um sistema de IGF testicular bem regulado quanto à função da gônada (Gupta, 2005). Parte desse sistema testicular de IGF é composto por algumas proteínas que também podem limitar a ação deste hormônio por se ligarem ao mesmo de forma semelhante às IGFBPs. Quatro das principais proteínas do plasma seminal, BSP-A1, -A2, -A3 e -30kDa, demonstraram se ligar ao IGF-II (Desnoyers e Manjunath, 1994) e ao IGF-I, confirmando o papel modulador dessas proteínas (Henricks *et al.*, 1998).

A presença do receptor de IGF-I sobre os espermatozoides e a presença deste hormônio no sêmen e a sua habilidade em estimular a motilidade espermática provê evidências de que o sistema IGF está envolvido também na fecundação (Henricks *et al.*, 1998). Uma vez que o receptor de IGF possui atividade tirosina quinase e seu ligante está presente no plasma seminal, o sistema IGF-I pode estar envolvido no sinal de transdução, conduzindo ao aumento da motilidade, a capacitação espermática e excitose acrossômica (Gupta, 2005).

Estes resultados demonstram que este fator de crescimento está envolvido também com a membrana espermática que é essencial para a comunicação entre a célula espermática, o meio externo e o ovócito. Esta idéia foi confirmada por Selvaraju *et al.* (2009), que trabalhando com búfalos verificaram que o grupo de animais que possuía IGF-I adicionado ao meio de manutenção das células espermática tinha maior

Dentre estes fatores destacam-se os de crescimento semelhante à insulina, seus receptores e as suas proteínas ligadoras (IGFBPs) que exercem papel essencial na regulação do crescimento e desenvolvimento celular (Gnessi *et ál.*, 1997). Os fatores de crescimento são polipeptídios que funcionam como reguladores parácrinos, autócrinos e endócrinos das células em crescimento e em diferenciação. Especificamente, o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I e II (IGF-I e -II) são hormônios ubíquos que exercem potente ação mitogênica, metabólica e de diferenciação sobre as células do corpo (Jones e Clemmons, 1995).

Os IGFs no fígado e em vários outros órgãos são frequentemente liberados em resposta a secreção pulsátil do hormônio do crescimento (GH). Contudo, a biossíntese dos IGFs não é exclusivamente regulada por este hormônio e ambas, IGF-I e -II, têm muitas ações que são independentes deste (MacPherson *et ál.*, 2002).

A transdução dos sinais dos IGFs ocorre quando um ligante se acopla a um dos três receptores específicos: receptor de IGF tipo I, receptor de IGF tipo II ou receptor de insulina. A disponibilidade de IGF é modulada por um grupo de seis proteínas de alta afinidade de ligação, designadas como proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 ao 6 (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6). A função destas proteínas é regulada pela interação entre a matriz extracelular e a superfície da célula, tão bem como pela sua protease específica (Jones e Clemmons, 1995).

Esta cadeia de multicomponentes moleculares tem sido identificada nos testículos de machos. Em várias espécies os IGFs, -I e -II, estão envolvidos na diferenciação e função das células de Leydig, estimulando a esteroidogênese por aumentar a densidade de recep-

tores para gonadotropinas e expressão de enzimas chave na esteroidogênese. Sendo, conseqüentemente, implicados como importantes fatores na espermatogênese (Spiteri-Greech e Nieschlag, 1993).

As funções testiculares do IGF-I parecem ser servidas pela sua produção local, sem uma contribuição endócrina. Isto sugere fortemente que o IGF-I testicular tem um papel determinante no desenvolvimento e diferenciação das células de Leydig e das células germinativas, e que a falta dessa substância no testículo pode induzir infertilidade (Gnessi *et ál.*, 1997). Corroborando esta idéia, Wang e Hardy (2004) determinaram que o IGF-I aumenta a proliferação de precursores mesenquimais e a diferenciação dessas células em células de Leydig. Sendo que o número de células de Leydig e de enzimas esteroidogênicas específicas a estas células são diminuídas em camundongos que são nulos para IGF-I.

Contudo, efeitos aditivos do tratamento com LH e IGF-I sobre o número de células testiculares são observados, indicando que esses dois hormônios atuam sobre essas células usando caminhos de sinalização distintos (Wang e Hardy, 2004; Brito *et ál.*, 2007). O IGF-I auto-regula os receptores de LH e a secreção de testosterona, enquanto a testosterona, em retorno, auto-regula os receptores de IGF-I e a produção para este hormônio pelas células de Leydig (Wang e Hardy, 2004). Desta forma, o IGF-I circulante pode inicialmente auto-regular a produção de testosterona, a qual em retorno estimula a secreção de IGF-I e o estabelecimento da retroalimentação positiva entre IGF-I e a testosterona secretada nas células de Leydig. A forte associação do IGF-I circulante com o tamanho testicular sugere que este fator de crescimento pode ter efeito mitogênico direto sobre os testículos, podendo regular não somente a esteroidogênese testicular, mas também a proliferação celular em determinada fase da vida do animal (Brito *et ál.*, 2007).

integridade do plasmalema e da membrana funcional, indicando que essa adição do IGF-I pode ser útil na melhora da habilidade fecundante do espermatozóide, sugerindo um novo papel do IGF-I no plasma seminal.

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUAS CORRELAÇÕES COM A QUALIDADE ESPERMÁTICA: DESTAQUE AO ANTÍGENO ASSOCIADO À FERTILIDADE

Durante várias décadas, cientistas têm se esforçado para desenvolver ensaios de laboratório para prever com precisão o potencial de fertilidade de um determinado indivíduo. Em alguns casos, o simples conhecimento se um macho é fértil já é adequado. Contudo, maior estimativa da fertilidade de uma amostra de sêmen é normalmente desejada (Braundmeier e Miller, 2001).

Este problema tem sido um desafio por diversas razões: primeiro, ensaios de laboratório geralmente examinam todos os espermatozóides na coleção. Contudo, durante a fecundação, apenas um fertiliza o óvulo, podendo ser um espermatozóide altamente selecionado que não representa a média das células avaliadas no ejaculado; segundo, muitos ensaios testam somente um único atributo. Isto é pouco para medir com precisão a fertilidade, pois os espermatozóides devem satisfazer muitos requisitos para alcançar a fecundação bem sucedida. Requerendo, desta forma, o exame de várias características (Braundmeier e Miller, 2001).

A combinação certa de ensaios de laboratório deverá permitir não só testar a capacidade dos espermatozóides para chegar ao local de fecundação, mas também a capacidade destes em fecundar o óvulo e ativar o seu desenvolvimento embrionário com sucesso. Com isto em mente, uma série de ensaios tem sido desenvolvida, que vão desde simples testes vi-

suais, tais como motilidade e morfologia, a exames mais detalhados para avaliar as moléculas envolvidas durante a interação espermatozóide-ovócito, destacando-se entre elas as proteínas contidas no plasma seminal (Braundmeier e Miller, 2001).

A abundância de uma variedade de proteínas tem sido proposta para indicar a fertilidade masculina. Contudo, como nos testes de atributos dos espermatozóides, é pouco provável que as análises moleculares, individualmente, possam detectar uma redução de fertilidade em todas as amostras de sêmen. Sendo que uma bateria de indicadores moleculares possa ser mais valiosa. Algumas destas moléculas podem estar relacionadas com a fertilidade por causa de sua função vital, enquanto que outras podem indicar problemas gerais durante a espermatogênese e/ou na maturação espermática (Braundmeier e Miller, 2001).

Corroborando com a idéia da presença de moléculas que atuem na função vital da célula, McCauley *et al.* (1999) relataram que a adição de uma variedade de proteínas e constituintes lipídicos durante a maturação epididimária exerceram um importante papel na capacitação espermática, processo essencial à fecundação. Essas proteínas são produzidas principalmente nas vesículas seminais e na próstata, afetando positivamente a fertilidade (Bellin *et al.*, 1998; McCauley *et al.*, 1999).

As glândulas sexuais acessórias secretam proteínas com afinidade a heparina (HBP) como um componente importante do líquido seminal (McCauley *et al.*, 1999). As HBP têm uma afinidade maior para compostos de ligação similares à heparina, tal como os glicosaminoglicanos (GAG), que são produzidos ao longo do trato reprodutivo da fêmea (Ax *et al.*, 1999). Uma vez ligada à membrana espermática, a HBP provê um aumento no número dos locais de ligação para heparina. Portanto, o GAG encontrado no trato reprodutivo da fêmea, conseqüentemente, faci-

lita a capacitação e a reação acrossômica na célula espermática (Miller *et ál.*, 1990).

Dentre as proteínas com afinidade à heparina encontradas no plasma seminal, destacam-se as BSP-A1, -A2, -A3 e de 30kDa. Todos os membros dessa família de proteínas são glicosilados, com exceção da BSP-A3. As BSP-A1 e -A2, denominadas de PDC-109, têm sequências de aminoácidos idênticas, mas diferem na extensão da glicosilação. Contudo, ambas as proteínas, BSP-A3 e -30 kDa têm composição de aminoácidos que são diferentes da -A1/-A2. A determinação da sua sequência de aminoácidos mostra que as BSP-A1/-A2 e -A3 são estruturalmente dispostas paralelamente em duas unidades de repetição de 38-41 aminoácidos que são similares as estruturas do tipo-II presentes no domínio de ligação gelatina da fibronectina do fator XII do plasma humano ou do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo-II (Manjunath *et ál.*, 1994).

Além dessas proteínas existem outras que possuem sítios de ligação para a heparina. Supostamente, estas proteínas atuam na capacitação espermática, semelhante ao que acontece com as BSP-A1, -A2 e -A3, sendo que a osteopontina é uma delas (Denhardt *et ál.*, 2001). Segundo revisão de Moura (2005), esta proteína possui peso molecular variando entre 25 e 80 kDa, sendo que em bovinos há presença de isoformas de peso molecular variando entre 14 e 55 kDa, sendo encontradas no plasma seminal e nas glândulas sexuais acessórias. Esta variação, quanto às isoformas, é possivelmente resultado de modificações pós-transdacionais, tais como clivagem, glicosilação e fosforilação (Moura, 2005).

A função da osteopontina no trato reprodutivo ainda não está bem definida. Alguns autores sugerem que esta proteína aumenta a capacidade de ligação com o cálcio, o que é importante para a fecundação. A relação da osteopontina com a fertilidade pode ainda

ser indireta (Cancel *et ál.*, 1999), atuando na proteção da superfície epitelial das glândulas acessórias contra infecções bacterianas (Brown *et ál.*, 1992), e ainda modificando características da membrana do espermatozóide (Cancel *et ál.*, 1999). Contudo, seu papel frente à ligação com a heparina ainda necessita ser confirmado.

Dentre as proteínas com afinidade à heparina, destaca-se a HBP de 30kDa, que foi descrita como antígeno associado à fertilidade (FAA) (Bellin *et ál.*, 1998; McCauley *et ál.*, 1999). Esta proteína foi localizada na região equatorial em espermatozóides humanos, indicando o seu potencial papel regulador nas interações espermatozóide-óvulo (Dawson *et ál.*, 2003).

Quando encontrada sobre os espermatozóides, a FAA pode aumentar a ligação de heparina, embora a função desta e de outras proteínas com afinidade a este glicosaminoglicano não seja clara (McCauley *et ál.*, 1999). Contudo, quando novilhas e vacas foram inseminadas com sêmen positivo para FAA a taxa de prenhez foi 15% maior do que em fêmeas inseminadas com amostras negativas para esta proteína (Sprott *et ál.*, 2006). Bellin *et ál.* (1998), utilizando touros em monta natural, demonstraram que os animais que foram positivos para FAA foram 9% mais férteis do que os que eram negativos para esta proteína.

Semelhante a estes estudos, Sprott *et ál.* (2006) analisaram o ejaculado de touros peripuberais ($n = 468$) em cinco diferentes populações para a presença de FAA. Os dados do exame andrológico destes animais foram comparados entre os touros com e sem FAA no ejaculado. A única variável que diferiu em todos os touros no momento da primeira coleta de sêmen foi o volume do ejaculado com touros negativos para FAA tendo maior volume ($p < 0,001$) do que touros positivos para esta proteína. Entre os touros que não tinham alcançado a puberdade, 70% foram positivos para FAA, enquanto 10 touros não tiveram FAA na

primeira coleta de sêmen, sugerindo que a produção de FAA no sêmen não é afetada por nenhuma variável, tipicamente mensurada, durante o exame andrológico. Sendo que a presença desta proteína pode ser determinada em um ejaculado com ou sem espermatozoides em touros peripuberais.

Quando touros foram selecionados para alta capacidade de serviço, o grupo de touros positivos para FAA foi ainda mais fértil do que o grupo de touros negativos para esta proteína. Em adição, vacas expostas a touros positivos para FAA foram fecundadas mais cedo, no início da estação de monta, resultando no aumento do número de bezerros mais velhos e mais pesados. Assim, em adição ao exame andrológico e ao teste da capacidade de serviço, a determinação do perfil de FAA pode ser usada como uma ferramenta para identificar touros subfértéis. Sendo que a seleção de touros positivos para FAA na criação de gado resulta em aumento da fertilidade dos mesmos e no desempenho vaca/bezerro (Bellin *et ál.*, 1998).

Desta forma, demonstra-se que a interação entre heparina e espermatozóide é um importante indicador do potencial de fertilidade do touro. Aonde espermatozoides de touros de maior fertilidade se ligam com maior afinidade a heparina, submetendo-se a maiores taxas de reação acrossômica, comparado a touros de menor fertilidade (Ax *et ál.*, 1985). Devido a outros estudos terem indicado que a habilidade do espermatozóide em se ligar à heparina e a outros glicosaminoglicanos é correlacionada com a qualidade e fertilidade da célula espermática, afirma-se que proteínas com afinidade à heparina no plasma seminal podem, positivamente, influenciar a fertilidade (Killian *et ál.*, 1993).

Essas proteínas ligam-se a superfície dos espermatozoides na ejaculação por sua interação com os fosfolipídios de membrana de colina. Uma vez que esses fosfolipídios são substratos da fosfolipase-A2, enzi-

ma chave implicada na reação acrossômica, o efeito das proteínas do plasma seminal sobre esta enzima foi investigado (Manjunath *et ál.*, 1994). Estes mesmos autores encontraram que as BSPs, no espermatozóide bovino, são co-localizados com as fosfolipases-A2, sendo possível que estas proteínas interajam diretamente com as enzimas das fosfolipases-A2 ligadas a membrana.

Estas enzimas podem ser estimuladas ou inibidas dependendo da concentração local das proteínas BSPs. Ao regular a atividade das enzimas, as proteínas BSPs podem modular a composição lipídica da membrana de espermatozoides submetidos à capacitação. Alternativamente, uma vez que as proteínas BSPs cobrem a superfície dos espermatozoides na ejaculação, via interação específica com os fosfolipídios colina, eles podem limitar a disponibilidade desses fosfolipídios para ação extracelular ou para a fosfolipase-A2 ligada à membrana. Neste contexto, pode ser que o fluido seminal bovino contenha fosfolipase-A2; contudo, a atividade é quase indetectável. Isto é presumivelmente devido às proteínas BSPs, que são inibidoras da atividade da fosfolipase-A2, estarem presentes em uma concentração muito alta no fluido seminal (Manjunath *et ál.*, 1994).

Contudo apesar dos efeitos positivos das proteínas no plasma seminal, segundo revisão de Folhadella (2008), efeitos desfavoráveis de certas proteínas contidas neste fluido sobre os espermatozoides também já foram descritos, como o relatado por Shivaji e Bhargava (1987) que relatou que a presença em alta concentração das proteínas de peso molecular entre 15-16 kDa prejudicou a motilidade espermática. Além disso, proteínas como a seminalplasmina bovina inibem a capacitação espermática e a reação acrossômica, o que interfere negativamente na fecundação.

Entretanto o perfil das proteínas no plasma seminal associado positivamente com a fertilidade ganha

maior foco nas pesquisas, sendo que dentro da gama de proteínas presentes no plasma seminal destaca-se ainda a proteína de 26 kDa que é 75% idêntica e 100% homóloga a uma prostaglandina D sintase tipo lipocalina (PDGS). O papel fisiológico das PGDS no trato reprodutor masculino não está bem claro. Todavia, há relatos na literatura que sugerem sua associação com a fertilidade (Gerena *et ál.*, 1998).

Outra importante proteína encontrada em grande quantidade no plasma seminal é a proteína ácida do fluido seminal (aSFP) com peso molecular de 12,9 kDa, secretada pelas vesículas seminais, ampolas e epidídimo. Esta proteína tem demonstrado ser um bom marcador bioquímico para a alta fertilidade dos touros (Roncolleta, 2003), pois preserva a integridade da membrana, agindo como um redutor da peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide, além de regular a atividade mitocondrial e, conseqüentemente, a motilidade espermática (Schöneck *et ál.*, 1996).

McCauley *et ál.* (2001) relataram ainda a presença no sêmen bovino, de uma proteína de 24 kDa que apresenta 90% de homogeneidade com a proteína inibidora das metaloproteinases de matriz-2 (TIMP2). Esses mesmos autores identificaram a presença de RNA mensageiro para esta proteína nas glândulas bulbouretrais, próstata e vesícula seminal. Estas pro-

teínas regulam processos fisiológicos associados com a ovulação, fecundação, desenvolvimento embrionário, proliferação de vários tipos celulares e produção de progesterona pelas células estereoidogênicas (Boujrad *et ál.*, 1995), porém a sua função ainda não é muito bem definida (Folhadella, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por marcadores seminais que possam identificar precocemente animais de maior fertilidade trará grande ganho aos sistemas de criação, pois propiciará cada vez mais o avanço genético em um menor intervalo de tempo. Atualmente, há certas proteínas encontradas no plasma seminal que cumprem esse papel. Entretanto, as mesmas não podem ser utilizadas, isoladamente, como único marcador para determinar o estado reprodutivo futuro de um animal. Indiscutivelmente, por mais que se busque uma determinada molécula sinalizadora dessa condição futura, devemos lembrar que a mesma é dirigida por uma rede integrada de hormônios, enzimas, peptídeos e demais moléculas. Podendo, às vezes, refletir a expressão de uma determinada condição, como excesso ou ausência de certos hormônios ou proteínas. Entretanto, não ficando limitado a isto. Ressaltando, desta maneira, a necessidade do estudo integrado entre os vários braços que compõem e/ou interferem no estado reprodutivo.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelmonein, I. Y., Beth, R., Saba, K. and Kenneth, G. G. "The Effects of Antifreeze Peptide III (AFP) and Insulin Transferrin Selenium (ITS) on Cryopreservation of Chimpanzee (*Pan Troglodytes*) Spermatozoa". *Journal of Andrology* 19. (1998): 207-221.
- Ahima, R. S., Saper, C. B., Flier, J. S. and Elmquist, J. K. "Leptin Regulation of Neuroendocrine Systems". *Frontiers in Neuroendocrinology* 21. (2000): 263-307.
- Andò, S. and Aquila, S. "Arguments Raised by The Recent Discovery that Insulin and Leptin are Expressed in and Secreted by Human Ejaculated Spermatozoa". *Molecular and Cellular Endocrinology* 245. (2005): 1-6.
- Aquila, S., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S. and Andò, S. "Autocrine Regulation of Insulin Secretion in Human Ejaculated Spermatozoa". *Endocrinology* 146. (2005): 552-557.

- Ax, R. L., Bellin, M. E., Zhang, H. M. and Hawkins, H. E. New Approach to Estimating Bull Fertility. Proceedings, The Range Beef Cow Symposium XVI. Greeley, Colorado. 1999.
- Ax, R.L., Dickson, K. and Lenz, R. W. "Induction of Acrosome Reactions by Chondroitin Sulfates in Vitro Corresponds to Nonreturn Rates of Dairy Bulls". *Journal of Dairy Science* 68. (1985): 387-390.
- Baccetti, B., La Marca, A., Piomboni, P., Capitani, S., Bruni, E., Petraglia, F. and De Leo, V. "Insulin-Dependent Diabetes in Men is Associated with Hypothalamo-Pituitary Derangement and with Impairment in Semen Quality". *Human of Reproduction* 17. (2002): 2673-2677.
- Bellin, M. E., Oyarzo, J. N., Hawkins, H. E., Zhang, H., Smith, R. G., Forrest, D. W., Sprott, L. R. and Ax, R. L. "Fertility-Associated Antigen on Bull Sperm Indicates Fertility Potential". *Journal of Animal Science* 76. (1998): 2032-2039.
- Boujrad, N., Ogwuegbu, S. O., Garnier, M. Lee, C. H., Martin, B. M. and Papadopoulos, V. "Identification of a Stimulator of Steroid Hormone Synthesis Isolated from Testis". *Science* 268. (1995): 1609-1612.
- Bradford, B. J., Oba, M., Ehrhardt, R. A., Boisclair, Y. R. and Allen, M. S. "Propionate is not an Important Regulator of Plasma Leptin Concentration in Dairy Cattle". *Domestic Animal Endocrinology* 30. (2006): 65-75.
- Braundmeier, A. G. and Miller, D. J. "The Search is on: Finding Accurate Molecular Markers of Male Fertility". *Journal of Dairy Science* 84. (2001): 1915-1925.
- Brito, L. F. C., Barth, A. D., Rawlings, N. C., Wilde, R. E., Crews Jr., D. H., Mir, P. S. and Kastelic, J. P. "Effect of Nutrition During Calfhood and Peripubertal Period on Serum Metabolic Hormones, Gonadotropins and Testosterone Concentrations, and on Sexual Development in Bulls". *Domestic Animal Endocrinology* 33. (2007): 1-18.
- Brown, L. F., Berse, B., Van Der Water, L., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C. A., Manseau, E. J., Dvorak, H. F. and Senger, D. R. "Expression and Distribution of Osteopontin in Human Tissues: Widespread Association with Luminal Epithelial Surfaces". *Molecular Biology of the Cell* 3. (1992): 1169-1180.
- Cancel, A. M., Chapman, D. A. and Killian, G. J. "Osteopontin Localization in the Holstein Bull Reproductive Tract". *Biology of Reproduction* 60. (1999): 454-460.
- Caprio, M., Fabbrini, E., Ricci, G., Basciani, S., Gnessi, L., Arizzi, M., Carta, A. R., De Martino, M. U., Isidori, A. M., Frajese, G. V. and Fabbri, A. "Ontogenesis of Leptin Receptor in Rat Leydig Cells". *Biology of Reproduction* 68. (2003): 1199-1207.
- Colombo, J. B. and Naz, R. K. "Modulation of insulin-Like Growth Factor-1 in The Seminal Plasma of Infertile Men". *Journal of Andrology* 20. (1999): 118-125.
- Cunningham, D. V. M. Tratado de fisiologia veterinária. 2 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- Dawson, G. R., Mccauley, T. C., Oyarzo, J. N., Grossman, J. S., Marks, S. H. F. and Ax, R. L. "Immunolocalization of Fertility-Associated Antigen (FAA) on Bovine, Equine, and Human Sperm". *Fertility and Sterility* 80. Suppl. 3. (2003): 240-241.
- Denhardt, D. T., Giachelli, C. M. and Rittling, S. "Role of Osteopontin in Cellular Signaling and Toxicant Injury". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41. (2001): 723-749.
- Desnoyers, L. and Manjunath, P. "Major Proteins of Bovine Seminal Fluid Bind to Insulin-like Growth Factor-II". *Journal of Biology and Chemistry* 269. (1994): 5776-5780.
- Folhadella, I. M. "Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir". Tese Doutorado em Ciência

- Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2008.
- Friedman, J. M. and Halaas, J. L. "Leptin and Regulation of Body Weight in Mammals". *Nature* 395. (1998): 763-770.
- Gerena, R. L., Irikura, D., Urade, Y., Eguchi, N., Chapman, D. A. and Killian, G. J. "Identification of a Fertility-associated Protein in Bull Seminal Plasma as Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase". *Biology of Reproduction* 58. (1998): 826-833.
- Glander, H-J., Lammert, A., Paasch, U., Glasow, A. and Kratzsch, J. "Leptin Exists in Tubuli Seminiferi and in Seminal Plasma". *Andrology* 34. (2002): 227-233.
- Gnessi, L., Fabbri, A. and Spera, G. "Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local Environment". *Endocrine Reviews* 8. (1997): 541-609.
- Gupta, G. S. Non-Steroidal Signal Molecules in Spermatogenesis. In: Proteomics of Spermatogenesis. New York: Springer-Verlag, 2005, pp.47-76.
- Henricks, D. M., Kouba, A. J., Lackey, B. R., Boone, W. R. and Gray, S. L. "Identification of Insulin-Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa: Influence on Sperm Motility". *Biology of Reproduction* 59. (1998): 330-337.
- Jelínková, P., Manásková, P., Tichá, M. and Jonáková V. "Proteinase Inhibitors in Aggregated Forms of Boar Seminal Plasma Proteins". *International Journal of Biological Macromolecules* 32. (2003): 99-107.
- Jones, J. I. and Clemmons, D. R. "Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions". *Endocrinology Reviews* 16. (1995): 3-34.
- Killian, G. J., Chapman, D. A. and Rogowski, L. A. "Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma". *Biology of Reproduction* 49. (1993): 1202-1207.
- Kraus, M., Tichá, M., Zelezná, B., Peknicová, J. and Jonáková, V. "Characterization of Human Seminal Plasma Proteins Homologous to Boar AQN Spermadhesins". *Journal of Reproductive Immunology* 65. (2005): 33-46.
- Luukkaa, V., Pesonen, U., Huhtaniemi, I., Lehtonen, A., Tilvis, R., Tuomilehto, J., Koulu, M. and Huupponen, R. "Inverse Correlation between Serum Testosterone and Leptin in Men". *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83. (1998): 3243-3246.
- MacPherson, M. L., Simmen, R. C. M., Simmen, F. A., Hernández, J., Sheerin, B. R., Varner, D. D., Loomis, P., Cadario, M. E., Miller, C. D., Brinsko, S. P., Rigby, S. and Blanchard, T. L. "Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 and -5 in Equine Seminal Plasma: Association with Sperm Characteristics and Fertility". *Biology of Reproduction* 67. (2002): 648-654.
- Manjunath, P., Soubeyrand, S., Chandonnet, L. and Roberts, K. D. "Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Inhibit Phospholipase A2". *Biochemical Journal* 303. (1994): 121-128.
- McCauley, T. C., Zhang, H., Bellin, M. E. and Ax, R. L. "Purification and Characterization of Fertility-Associated Antigen (FAA) in Bovine Seminal Fluid". *Molecular Reproduction and Development* 54. (1999): 145-153.
- McCauley, T. C., Zhang, H. M., Bellin, M. E. and Ax, R. L. "Identification of a Heparin-Binding Protein in Bovine Seminal Fluid as Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2". *Molecular Reproduction & Development* 58. (2001): 336-341.

- Miao, Z-R., Lin, T. K., Bongs, T. A., Zhou, X., Cohen, P. and Lee, K-O. "Effect of Insulin-Like Growth Factors (IGFs) and IGF-Binding Proteins on In Vitro Sperm Motility". *Clinical Endocrinology* 49. (1998) 235-239.
- Miller, D. J., Winer, A. and Ax, R. L. "Heparin-Binding Proteins from Seminal Plasma Bind to Bovine Spermatozoa and Modulate Capacitation by Heparin". *Biology of Reproduction* 42. (1990): 899-915.
- Miller, W. L. "Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis". *Endocrine Reviews* 9. (1988): 295-318.
- Moura, A. A. "Seminal Plasma Proteins and Fertility Indexes in The Bull: The Case for Osteopontin". *Animal Reproduction* 2. (2005): 3-10.
- Nakayama, Y., Yamamoto, T. and Abe, S. I. "IGF-I, IGF-II and Insulin Promote Differentiation of Spermatogonia to Primary Spermatocytes in Organ Culture of Newt Testes". *International of Journal Developmental Biology* 43. (1999): 343-347.
- Ritzen, E. M. "Chemical Messengers between Sertoli Cells and Neighbouring Cells". *Journal Steroids Biochemistry* 19. (1983): 499-504.
- Roncoletta, M. "Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros". Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 2003.
- Ruiz-Cortes, Z. T. and Olivera-Angel, M. "Association between Leptin Receptor Expression in Testis, Leptin and Testosterone Levels, and Onset of Puberty in Holstein x Zebu Calves". *Biology of Reproduction* 81. (2009): 678.
- Sánchez-Luengo, S., Fernández, P.J. and Romeu, A. "Insulin Growth Factors may be Implicated in Human Sperm Capacitation". *Fertility and Sterility* 83. (2005): 4.
- Schöneck, C., Braum, J. and Einspanier, R. "Sperm Viability is Influenced *In Vitro* by The Bovine Seminal Protein aSPF: Effects on Motility, Mitochondrial Activity and Lipid Peroxidation". *Theriogenology* 45. (1996): 633-642.
- Selvaraju, S., Reddy, I. J., Nandi, S., Rao, S. B. N. and Ravindra, J. P. "Influence of IGF-I on Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa Motility, Membrane Integrity, Lipid Peroxidation and fructose Uptake In Vitro". *Animal Reproduction Science* 113. (2009): 60-70.
- Shivaji, S. and Bhargava, P. M. "Antifertility Factors of Mammalian Seminal Fluid". *BioEssays* 7. (1987): 13-17.
- Sih, R., Morley, J. E., Kaiser, F. E., Perry, H. M., Patrick, P. and Ross, C. "Testosterone Replacement in Older Hypogonadal Men: a 12-Month Randomized Controlled Trial". *Journal of Clinical & Endocrinology Metabolism* 82. (1997): 1661-1667.
- Spiteri-Greech, J and Nieschlag, E. "Paracrine Factors Relevant to The Regulation of Spermatogenesis-a Review". *Jornal of Reproduction Fertility* 98. (1993): 1-14.
- Sprott, L. R., Gallino, J. L., Novasod, A. M., Forrest, D. W., Mccauley, T. C., Dawson, G. R. and Ax, R.L. "Case Study: Fertility-Associated Antigen in Peripubertal Beef Bulls". *The Professional Animal Scientist* 22. (2006): 353-357.
- Tena-Sempere, M. and Barreiro, M. L. "Leptin in Male Reproduction: The Testis Paradigm". *Molecular and Cellular Endocrinology* 188. (2002): 9-13.
- Tena-Sempere, M., Manna, P. R., Zhang, F-P, Pinilla, L., González, L. C., Dieguez, C., Huhtaniemi, I. and Aguilar, E. "Molecular Mechanisms of Leptin Action in Adult Rat Testis: Potential Targets for

- Leptin-Induced Inhibition of Steroidogenesis and Pattern of Leptin Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression". *Journal of Endocrinology* 170, (2001): 413-423.
- Tena-Sempere, M., Pinilla, L., González, L. C., Dieguez, C., Casanueva F. F. and Aguilar, E. "Leptin Inhibits Testosterone Secretion from adult Rat Testis In Vitro". *Journal of Endocrinology* 161. (1999): 211-218.
- Van Tilburg, M. F., Silva, J. F. S., Dias, A. J. B., Quirino, C. R. e Fagundes, B. "Influência da Insulina na Congelabilidade do Sêmen de Ovino". *Ciência Animal Brasileira* 9. (2008): 731-739.
- Wang, G. and Hardy, M. P. Development of Leydig Cells in The Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) Knockout Mouse: Effects of IGF-I Replacement and Gonadotropic Stimulation. *Biology of Reproduction* 70. (2004): 632-639.
- Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E. and Neill, J. D. (eds.). *Physiology of Reproduction*. 2nd edition. New York: Raven Press, 1994, pp. A189-A317.