

Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática

Protein markers of fertility in the seminal plasma and plasma membrane

Maria Inês Mascarenhas Jobim¹, Ricardo Macedo Gregory, Rodrigo Costa Mattos

Laboratório de Tecnologia de Sêmen e Proteínas na Reprodução Animal, UFRGS, 90540-000 Porto Alegre, RS, Brasil

¹E-mail: ines.jobim@ufrgs.br

Resumo

A expectativa de dispor de marcadores que auxiliem a indicação do potencial reprodutivo animal tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas, que provavelmente poderão contribuir significativamente na escolha de reprodutores superiores. Os resultados mais significativos envolvendo índices de fertilidade “in vivo” indicam proteínas candidatas a marcadores. Estes estudos foram realizados em reprodutores da raça Holandesa baseado nas taxas de não retorno de milhares de vacas submetidas a inseminações, utilizando doses de sêmen congelado, processadas segundo padrões metodológicos bem definidos (Moura *et al.*, 2006a). Baseado nos experimentos recentes as seguintes proteínas são as principais candidatas a serem marcadores de fertilidade: osteopontina (OPN), prostaglandina D- sintase tipo lipocalina (PDGS), BSP-30 kDa, fosfolipase A2 (PLA-2), espermadésinas, proteínas de ligação à heparina, P25b e clusterina. Além destes marcadores, resultante de experimentos criteriosos baseados em taxas de não retorno em um número expressivo de animais sabe-se da existência de alguns outros marcadores, propostos como indicadores da fertilidade e descobertos muitas vezes ao acaso, e cujas funções até então são desconhecidas, portanto, o significado biológico de suas relações com a fertilidade ainda é desconhecido.

Palavras-chave: marcadores de fertilidade, proteínas, plasma seminal, fertilidade.

Abstract

Labels that can help to indicate the potential breeding of animals has been the subject of many researches in recent decades, which probably could contribute significantly in the selection of males with superior breeding qualities. The in vivo findings involving fertility levels can indicate protein markers. These studies were performed in no return rates of Holstein breeding on thousands of inseminated cows, using doses of frozen semen, processed second methodological standards well defined (Moura et al., 2006a). Recent experiments based on proteins, like osteopontin (OPN), prostaglandin D synthase-type lipocalin (PDGS), BSP-30 kDa, phospholipase A2 (PLA-2), spermadesin, proteins heparin biniding, P25b and clusterin are the main candidates to be markers of fertility. In addition to these markers, the result of careful experiments based on no return rates in a significant number of animals is known of the existence of some other markers, proposed as indicators of fertility and often discovered occasionally, and whose functions and biological relationship with fertility are mostly unknown.

Keywords: fertility markers, protein, seminal plasma and fertility

Introduction

A expectativa de dispor de marcadores que auxiliem a indicação do potencial reprodutivo animal tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas, que provavelmente poderão contribuir significativamente na escolha de reprodutores superiores.

As diferenças na fertilidade observadas entre os animais, muitas vezes não são detectadas pelos testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do sêmen. Esses métodos de avaliação tem sido objeto de importantes progressos nos últimos anos, embora nenhum teste de laboratório tenha provado ser totalmente seguro na predição da fertilidade (Berndtson e Pickett, 1980; Den Daas *et al.*, 1992; Amman, 1995). Análises bioquímicas, associadas aos critérios de avaliação espermática, poderiam auxiliar na identificação de diferenças importantes entre a fertilidade potencial dos animais. Neste sentido, estudos desenvolvidos mostram que há evidência de associações significativas entre a expressão de proteínas seminais e a fertilidade dos machos avaliada “in vivo” e “in vitro”. Tais proteínas são candidatas a marcadores moleculares da fertilidade (Killian *et al.*, 1993; Moura *et al.*, 2006a, b, 2007).

Os resultados mais significativos envolvendo índices de fertilidade “in vivo” indicam proteínas candidatas a marcadores. Estes estudos foram realizados em reprodutores da raça Holandesa baseado nas taxas de não retorno de milhares de vacas submetidas a inseminações, utilizando doses de sêmen congelado, processadas segundo padrões metodológicos bem definidos (Moura *et al.*, 2006a).

Baseado nos experimentos recentes as seguintes proteínas são as principais candidatas a serem marcadores de fertilidade:

Osteopontina (OPN)

Avaliando o plasma seminal de touros Holandeses ($n = 35$) de fertilidade conhecida, Killian *et al.* (1993) identificaram nos animais de alta fertilidade uma proteína de 55 kDa, pI 4,5, posteriormente identificada por Cancel *et al.* (1997), como a osteopontina.

Estudos recentes mostraram que os índices de fertilidade de touros Holstein ($n = 37$) são associados a uma maior expressão de osteopontina, confirmando a relação positiva desta proteína com a fertilidade (Moura *et al.*, 2006a).

A osteopontina é uma glicoproteína ácida, que possui várias funções, detectada em várias espécies (Crivello e Delvin, 1992) e que se liga aos espermatozoides por ocasião da ejaculação (Souza *et al.*, 2008). A osteopontina bovina possui um sítio de ligação ao cálcio, e liga-se a várias integrinas através da seqüência de aminoácidos RGD, que permite a participação desta proteína na adesão e comunicação intracelular (denhardt *et al.*, 2001).

Muitos mecanismos foram atribuídos para a relação da OPN e a fertilidade: Cancel *et al.* (1999), mencionam que a relação pode ser indireta, através da proteção da superfície epitelial das glândulas acessórias contra infecções bacterianas, conferida por esta proteína (Brown *et al.*, 1992). Estes autores referem ainda que a osteopontina liga-se à receptores da integrina localizados na superfície do epitélio celular, podendo apresentar uma função protetora em infecções bacterianas. Como a OPN está envolvida na adesão celular através de receptores da família integrina (Craig *et al.*, 1989) e os receptores para integrina parecem ter um papel na ligação espermatozóide-ócito, na pré-implantação e na implantação (Vinatier, 1995), isto poderia explicar a relação desta proteína com a fertilidade. No espermatozóide bovino, a OPN é uma proteína de potencial ligação à integrina do oócito, durante a fertilização (Erikson *et al.*, 2007).

Por outro lado, a OPN também pode modificar características da membrana plasmática do espermatozóide, o que também deve favorecer, a fertilidade (Cancel *et al.*, 1999).

Outros estudos mostram que a OPN do fluido das glândulas acessórias de reprodutores Holandeses de alta fertilidade está associada com um aumento na capacidade de penetração do espermatozóide no oócito (Moura *et al.*, 2007) e na prevenção da polispermia na espécie suína (Hao *et al.*, 2006) e bovina (Erikson *et al.*, 2007).

A OPN também induz a capacitação do espermatozóide bovino, através de mecanismos indeterminados, tendo igualmente um efeito positivo na viabilidade espermática, possivelmente através de bloqueio de vias apoptóticas (Erikson *et al.*, 2007).

O papel da OPN no processo reprodutivo também é demonstrado em experimentos conduzidos com fertilização “in vitro”. Estudos demonstram que anticorpos contra a osteopontina, quando adicionados ao meio de FIV, causam reduções significativas na percentagem de fertilização dos oócitos (Gonçalves *et al.*, 2007).

Prostaglandina D- sintase tipo lipocalina (PDGS)

O papel da Prostaglandina D- sintase tipo lipocalina na fertilidade é contraditório. Por um lado, uma maior expressão da PGDS no plasma seminal está associada com a alta fertilidade de touros holandeses, adultos, avaliada “in vivo” (Killian *et al.*, 1993; Gerena *et al.*, 1998); Por outro lado, três isoformas da PGDS do fluido epididimário apresentaram maior expressão em touros holandeses de baixa fertilidade (Moura *et al.*, 2006a). Estas observações concordam com as de Fouchécourt *et al.*, (2002) que verificaram baixas concentrações de PGDS no sêmen de carneiros e touros de alta fertilidade. Logo grandes quantidades desta proteína, no trato genital, não são essenciais para a função reprodutiva, ou outras proteínas podem assumir sua função, quando a concentração desta proteína é baixa.

A prostaglandina D, uma proteína de 26 kDa, pI 6,2, é ativamente formada em vários tecidos e células (Ujihara *et al.*, 1988), incluindo os órgãos genitais de machos e fêmeas (Ujihara *et al.*, 1988; Blodorn *et al.*, 1996 e Gerena *et al.*, 1998). É a principal proteína secretada pelas células epiteliais do epidídimo em muitas espécies, como no ovino e no equino (Fouchécourt *et al.*, 1999), no bovino (Gerena *et al.*, 1998) e no homem (Tokugawa *et al.*, 1998). No bovino, a PGDS também foi localizada na região apical do acrossoma do espermatozóide ejaculado (Gerena *et al.*, 2000).

Através de estudo imunocitoquímico, a localização específica da prostaglandina foi verificada no tecido intersticial testicular, nas células de Sertoli e nas células principais da cauda do epidídimo de ratos. Tal localização sugere que esta proteína tem um papel no desenvolvimento e maturação espermática (Gerena *et al.*, 2000). Entretanto a exata função que a mesma exerce sobre os espermatozoides ainda não está esclarecida (Moura *et al.*, 2006b).

Estudos também mostram que anticorpos contra a PGDS causam reduções significativas nas taxas de fertilização “in vitro” de embriões bovinos (Goncalves *et al.*, 2007), o que sugere uma ação desta proteína no processo de fertilização, porém através de mecanismos ainda desconhecidos.

BSP-30 kDa

A expressão de isoformas da BSP 30 kDa no fluido das glândulas acessórias de reprodutores holandeses foi relacionada à alta fertilidade “in vivo” por Moura *et al.* (2006a).

Esch *et al.* (1983), Manjunath e Sairam (1987) e Manjunath *et al.* (1987) purificaram e caracterizaram as proteínas ácidas predominantes no plasma seminal bovino, denominadas respectivamente PDC-109 e BSP A1, BSP A2, BSP A3, BSP 30 kDa. Estas proteínas, no plasma seminal bovino, são as principais proteínas de ligação à heparina.

Proteínas homólogas as BSP foram identificadas no plasma seminal de eqüinos (HSP1, HSP2, EQ12; Calvete *et al.*, 1995), de suínos (pB1; Calvete *et al.*, 1997), de caprinos (GSP14, GSP15, GSP20, GSP22 kDa; Villemure *et al.*, 2003), de bizontes (BISV16, BISV17, BISV18, BISV28 kDa; Boisvert *et al.*, 2004), de ovinos (Jobim *et al.*, 2005; RSVP14, RSVP20, RSP15, RSP22, RSP24; Bergeron *et al.*, 2005).

As proteínas BSP A1, 16,5 kDa; A2, 16 kDa; A3, 15 kDa e BSP 30 kDa são secretadas pelas vesículas seminais e, no momento da ejaculação, ligam-se à superfície dos espermatozoides e também a glicosaminoglicanos do trato genital feminino (Manjunath *et al.*, 1993). Avaliando a ligação das proteínas BSP, Manjunath *et al.* (1994) verificaram que a BSP A1/A2 e a BSP 30 kDa exibiram uma alta atividade quando ligadas à calmodulina, o que pode influenciar no transporte intracelular do Ca^{2+} e na reação acrossomal. Desta forma, as proteínas BSP estariam envolvidas com a capacitação espermática e com a reação acrossomal, e, conseqüentemente, com os fenômenos de fertilização.

As proteínas BSP modulam a atividade da fosfolipase A2; regulando o metabolismo dos fosfolípidos da membrana espermática (Manjunath *et al.*, 1994). Os sítios de ligação dos colina-fosfolípidos na membrana espermática são substratos para a fosfolipase A2 (PLA2), uma enzima-chave na capacitação (Soubeyrand *et al.*, 1997). As BSP promovem a capacitação espermática pela remoção do colesterol da membrana plasmática (Thérien *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1998; Thérien *et al.*, 1999); diminuindo a taxa colesterol/fosfolípidos levando ao influxo de cálcio, e ao aumento do pH intracelular. Estes eventos são essenciais para que ocorra a reação acrossomal (McCauley *et al.*, 1996; Thérien *et al.*, 1999).

As associações positivas da BSP 30kDa com a fertilidade podem ser resultado de sua capacidade de atuar na capacitação espermática, evento fundamental para a fertilização e sobrevivência dos gametas masculinos no oviduto (Moura *et al.*, 2006a). Entretanto, em estudo de proteínas da membrana espermática provenientes de 20 touros da raça Nelore de fertilidade conhecida (baseado em dados da inseminação artificial de 7897 vacas), foi encontrada uma proteína (14,5 kDa pI 4,5) em maiores quantidades na membrana espermática de reprodutores de baixa fertilidade; esta proteína foi identificada como BSP-A3 (Roncoletta *et al.*, 2006). Uma maior quantidade das proteínas BSP, removeria mais colesterol e fosfolípidos da membrana espermática, resultando assim em uma maior desestabilização dessa membrana (manjunath e Thérien 2002). Através deste mecanismo Roncoletta *et al.* (2006) explicam as maiores concentrações da BSP-A3 encontradas nas membranas dos reprodutores de baixa fertilidade.

Fosfolipase A2 (PLA-2)

A expressão de isoformas da Fosfolipase A2 no fluido das glândulas acessórias de reprodutores holandeses também foi prevalente nos touros de alta fertilidade, embora a contribuição da PLA2 para a fertilidade “in vivo” foi significativa, porém pequena (Moura *et al.*, 2006a).

Esta proteína no plasma seminal bovino apresenta um peso molecular de 60 kDa e pI 5,6 (Soubeyrand *et al.*, 1997), enquanto que análises do componente protéico da membrana espermática detectaram uma isoforma de PLA2 com 16 kDa (Ronkko *et al.*, 1991).

A PLA2 associada à membrana espermática participa da síntese de ácido araquidônico quando ativada pela progesterona, Ca^{2+} e proteína kinase C. O ácido araquidônico é então convertido em prostaglandina E2 pela ciclooxigenase, a qual induz o fluxo de Ca^{2+} através da membrana espermática ocasionando a fusão das membranas e a reação acrossômica. A prostaglandina E2 ativa posteriormente a fosfolipase A2 causando um incremento na entrada de cálcio (Breitbart e Spungin, 1997). A PLA2 também participa da interação do espermatozoide com o ócito (Riffo *et al.*, 1997), sendo ativada pela interação com a zona pelúcida e de mecanismos intracelulares de mensageiros secundários (Yuan *et al.*, 2003).

A fosfolipase A2 apresenta-se como uma enzima multifuncional e as associações da mesma com a fertilidade pode ser conseqüência de vários fatores (Moura *et al.*, 2006a).

Espermadesinas

As espermadesinas são uma família de glicoproteínas de baixo peso molecular (12-16 kDa), que apresentam diferentes funções (Romero *et al.*, 1997). Estas proteínas ligam-se à superfície do espermatozóide ejaculado (Sanz *et al.*, 1992; Töpfer-Petersen *et al.*, 1998). Até o momento, as espermadesinas foram identificadas no plasma seminal suíno (AWN, AQN-1, AQN-3, Calvete *et al.*, 1996; PSPI/PSP-II, Varela *et al.*, 1997), bovino (aSFP, Wempe *et al.*, 1992; Z13, Tedeschi *et al.*, 2000), eqüino (HSP-7, Reinert *et al.*, 1996) e no ovino (Espermadesina de 15,5 kDa, Bergeron *et al.*, 2005).

A espermadesina Z13 é uma proteína que apresenta uma relação inversa com a fertilidade, mostrando maior intensidade no fluido das glândulas acessórias dos reprodutores bovinos de baixa fertilidade (Moura *et al.*, 2006a). De acordo com os achados deste estudo, estão os observados por Killian *et al.* (1993), que utilizando a mesma técnica, e a mesma raça holandesa, verificaram um peptídeo de baixo peso molecular mais abundante no plasma seminal de reprodutores de baixa fertilidade, que foi chamado de fator antifertilidade, e posteriormente foi identificado como a espermadesina Z13 (Moura *et al.*, 2006a).

A espermadesina Z13 possui 50% da seqüência de aminoácidos idêntica à proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP) e 43 % de homologia com inibidores de motilidade espermática (SPMI) encontrado no plasma seminal de humanos (Tedeschi *et al.*, 2000; Robert e Gagnon, 1996) e de suínos (Iwamoto *et al.*, 1995).

A aSFP liga-se somente à superfície do espermatozóide ejaculado e, para que ocorra a fertilização *in vitro*, é necessário a liberação desta proteína da membrana espermática. Isto sugere que a aSFP atua como fator decapacitante do espermatozóide bovino, ao invés de molécula de ligação à zona pelúcida, não possuindo, assim, um papel na interação de gametas (Dostalova *et al.*, 1994). Foi sugerido que a estrutura da aSFP pode ser responsável pela preservação da membrana, possuindo um efeito antioxidativo na peroxidação lipídica da membrana da célula espermática *in vitro*. Esse efeito é dose dependente, e altos níveis desta proteína podem inibir a motilidade espermática e a atividade mitocondrial (Schöneck *et al.*, 1996).

Os inibidores da motilidade interferem com a atividade da ATPase e, portanto reduzem a freqüência de movimento do flagelo e velocidade dos espermatozoides (Iwamoto *et al.*, 1995). Moura *et al.*, (2006a) sugerem que a menor fertilidade de touros com altos níveis de espermadesina Z13 deva-se à capacidade desta proteína de alterar aspectos da motilidade espermática, devido à homologia desta proteína com as espermadesinas do suíno e do homem. Outras espermadesinas isoladas do plasma seminal do suíno como as AQN1, AQN3, AWN, PSPI, e PSPII, podem também influenciar a motilidade espermática (Centurión *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004) e a capacidade de penetração no ócito (Caballero *et al.*, 2004), sugerindo a existência de um complexo mecanismo destas proteínas no macho.

Estudando as proteínas da membrana espermática de 20 touros da raça Nelore de fertilidade conhecida (baseado em dados da inseminação artificial de 7897 vacas) foi encontrada uma proteína que apresentou uma concentração 8,5 vezes superior nas membranas dos reprodutores de alta fertilidade, identificada como aSFP (Roncoletta *et al.*, 2006). Esta proteína atuaria como fator decapacitante, prevenindo a prematura capacitação e reação acrossômica (Dostalova *et al.*, 1994) e como responsável pela preservação da membrana pelo efeito antioxidativo na peroxidação lipídica da membrana da célula espermática *in vitro* (Schöneck *et al.*, 1996).

Proteínas de ligação à heparina

Outro grupo de pesquisadores utilizando índices de fertilidade “in vivo” em um número significativo de animais de raças de corte identificou uma série de proteínas de ligação a heparina como indicadores de fertilidade em touros (Bellin *et al.*, 1994, 1996; McCauley *et al.*, 1996, 2001). As proteínas de ligação à heparina (HBPs) foram identificadas em várias espécies: no bovino (Chandonnet, *et al.*, 1990), no eqüino (Frazer e Bucci, 1996), no suíno (Calvete, *et al.*, 1996), no cão (Souza *et al.*, 2006), e no búfalo (Hiron *et al.*, 2006).

A heparina é um glicosaminoglicano, isto é, um polissacarídeo de alto peso molecular, que é secretado, particularmente na fase folicular, pelo trato reprodutivo da fêmea, (Lenz *et al.*, 1983) e que se liga ao espermatozóide bovino através de proteínas (HBPs), sendo capaz de induzir a capacitação (Lenz *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1990).

As proteínas de ligação à heparina (HBPs) são produzidas pelas glândulas acessórias do macho (próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais) (Nass *et al.*, 1990). Espermatozoides de touros de alta fertilidade apresentaram grande afinidade de ligação com a heparina do que os de reprodutores de menor fertilidade (Marks e Ax, 1985). Uma maior afinidade de ligação à heparina corresponde a maiores taxas de reação acrossômica (Ax *et al.*, 1985; Ax and Lenz, 1987; Lenz *et al.*, 1988).

Os experimentos de Bellin *et al.*, (1996) observaram três proteínas caracterizadas como HBPs. Os autores mostraram que reprodutores com HBPs em suas membranas eram mais férteis que aqueles em que as proteínas eram indetectáveis. Os reprodutores com as três HBPs (30, 24 e 21 kDa) identificadas em suas membranas tinham a maior fertilidade (81,5%). Quando a HBP de 24 kDa estava ausente, havia uma redução na fertilidade (61,3%) e quando não possuíam HBPs em suas membranas, a fertilidade foi a mais

baixa (41,9%).

A proteína de ligação à heparina HBP-24, observada e relacionada por Bellin *et al.* (1996) à fertilidade de reprodutores bovinos, quando seqüenciada, posteriormente apresentou 90% de identidade com a TIMP-2 (McCauley *et al.*, 2001). A proteína de ligação à heparina HBP-30 foi denominada posteriormente de antígeno associado à fertilidade (FAA), e foi verificado que touros FAA positivo eram 19% mais férteis do que aqueles FAA negativos (Bellin *et al.*, 1998).

P25b

O potencial de fertilidade pode também ser avaliado pela P25b, considerada um marcador da fertilidade bovina (Parent *et al.*, 1999). Esta proteína é membro da família da superfície espermática encontrada em várias espécies: P26h no hamster (Sullivan e Bleau, 1985), P34H no homem (Boué *et al.*, 1996) e P31m no macaco (Lamontagne *et al.*, 2001). Reprodutores bovinos de alta fertilidade apresentaram grandes quantidades de P25b, enquanto que pequenas quantidades desta proteína foram detectadas nos de baixa fertilidade (Parent *et al.*, 1999). A infertilidade no homem (Boué *et al.*, 1996; Guillemette *et al.*, 1999) assim como a baixa fertilidade em bovinos (Parent *et al.*, 1999) está associada a baixos níveis desta proteína.

Clusterina

A clusterina foi outra proteína que apresentou uma relação inversa com a fertilidade. Em bovinos, taxas de imunodeteção positiva de clusterina nos espermatozóides foram inversamente correlacionadas com taxas de fertilidade (Ibrahim *et al.*, 2000).

A clusterina é uma glicoproteína que, no homem, possui sítios de ligação à heparina (Pankhurst *et al.*, 1998) e pode regular o transporte e redistribuição de lipídeos no plasma sanguíneo humano (Jenne *et al.*, 1991). É abundante no fígado, cérebro e testículo bovino (Palmer e Christie, 1992), e no epidídimo de várias espécies (Fouchecourt *et al.*, 2000), estando presente ainda no plasma seminal, bem como na superfície da membrana da célula espermática do bovino e do homem (Howes *et al.*, 1998). A clusterina está envolvida em vários processos fisiológicos, incluindo adesão e agregação celular (Blaschuk *et al.*, 1983) e maturação espermática (Sylvester *et al.*, 1991).

Conclusões e perspectivas futuras

Os estudos sobre as proteínas do plasma seminal avançaram notoriamente nas últimas décadas, mas apesar destes progressos ainda encontramos resultados bastante contraditórios.

Além destes marcadores, resultante de experimentos criteriosos baseados em taxas de não retorno em um número expressivo de animais sabe-se da existência de alguns outros marcadores, propostos como indicadores da fertilidade e descobertos muitas vezes ao acaso, e cujas funções até então são desconhecidas, portanto, o significado biológico de suas relações com a fertilidade ainda é desconhecido.

As perspectivas futuras estão embasadas no desenvolvimento de biotecnologias, geradas a partir dos resultados obtidos com as pesquisas básicas. Muitas destas biotecnologias foram licenciadas pelas universidades e patenteadas. Entre elas encontra-se disponível comercialmente um “indicador” de fertilidade, o anticorpo monoclonal para identificação do FAA (antígeno associado à fertilidade) nas membranas do espermatozóide bovino (Repro Tec, Inc. em cooperação com a Universidade do Arizona EUA– grupo prof. Roy Ax) para previsão da fertilidade de touros.

Referências

- Amann RP.** Evaluation of sperm quality: Can we pick the winners? *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 11, 1995, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.206-212.
- Ax RL, Dickson K, Lenz RW.** Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to non return rates of dairy bulls. *J Dairy Sci*, v.68, p.387-390, 1985.
- Ax RL, Lenz RW.** Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J Dairy Sci*, v.70, p.1477, 1987.
- Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB.** Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem*, v.258, p.7714-7720, 1983.
- Bellin ME, Hawkins HE, Ax R.** Fertility range of beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J Anim Sci*, v.72, p.2441-2448, 1994.
- Bellin ME, Hawkins HE, Oyarzo JN, Vanderboom R J, Ax RL.** Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *J Anim Sci*, v.74, p.173-182, 1996.



- Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR and Ax RL.** Fertility-associated antigen (FAA) on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci*, v.76, p.2032-2039, 1998.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P.** Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev*, v.71, p.461-470, 2005.
- Berndtson WER, Pickett BW.** Evaluation of frozen semen. In: Morrow DA (Ed.). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1980. p.347-354.
- Blodorn B, Mader M, Urade Y, Hayaishi O, Felgenhauer K, Bruck W.** Choroid plexus: the major site of mRNA expression for the beta-trace protein (prostaglandin D synthase) in human brain. *Neurosci Lett*, v.209, p.117-120, 1996.
- Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P.** Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol Reprod*, v.70, p.656-661, 2004.
- Boué F, Blais J, Sullivan R.** Surface localization of P34H an epididymal protein during maturation of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biol Reprod*, v.54, p.1009-1017, 1996.
- Breitbart H, Spungin B.** The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*; v.3, p.195-202, 1997.
- Brown LF, Berse B, Van De Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau ej, Dvorak HF, Senger DR.** Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*, v.3, p.1169-1180, 1992.
- Caballero I, Vazquez JM, Gil MA, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA.** Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *J Androl*, v.25, p.1004-1012, 2004.
- Calvete JJ, Carrera E, Sanz L, Töpfer-Petersen E.** Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Biol Chem*, v.377, p.521-527, 1996.
- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Töpfer-Petersen E.** Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J*, v.310, p.615-622, 1995.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen E.** Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett*, v.407, p.201-206, 1997.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ.** Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v.57, p.1293-1301, 1997.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ.** Osteopontin localization in the holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod*, v.60, p.454-460, 1999.
- Centurión F, Vázquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, García EM, Martínez EA.** Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol Reprod*, v.69, p.640-646, 2003.
- Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P.** Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev*, v.26, p.313-318, 1990.
- Craig AM, Smith JH, Denhard DH.** Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. *J Biol Chem*, v.264, p.9682-9689, 1989.
- Crivello JF, Delvin E.** Isolation and characterization of a Cdna for osteopontin-k, a kidney cell adhesion molecule with high homology to osteopontins. *J Bone Miner Res*, v.7, p.693-699, 1992.
- Den Daas JHG, Nieland JD, De Jong G.** The relation between number of spermatozoa inseminated per dose of semen and non-return rates for different sires. *J Dairy Sci*, v.94, p.320-327, 1992.
- Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling S.** Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.41, p.723-749, 2001.
- Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Hettel C, Riedel D, Schoneck C, Einspanier R, Topfer-Petersen E.** Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein(aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler*, v.375, p.457-461, 1994.
- Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Yng SY, Guillemin R.** Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, v.113, p.861-867, 1983.
- Erikson DW, Way AL, Chapman DA, Killian GJ.** Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reproduction*. v.133 p.909-917, 2007.
- Fouchécourt S, Charpigny G, Reinaud P, Dumont P, Dacheux JL.** Mammalian lipocalin-type prostaglandin D₂ synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions. *Biol Reprod*, v.66, p.458-467, 2002.
- Fouchécourt S, Dacheux F, Dacheux JL.** Glutathione-independent prostaglandin D₂ synthase in ram and stallion epididymal fluids: origin and regulation. *Biol Reprod*, v.60, p.558-566, 1999.
- Fouchécourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux J.** Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod*, 62:1790-1803, 2000.

- Frazer GS, Bucci DM.** Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, v.46, p.1389-1402, 1996.
- Gerena RL, Eguchi N, Urade Y, Killian GJ.** Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in adult murine testis and epididymis. *J Androl*, v.21, p.848-854, 2000.
- Gerena RL, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ.** Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod*, v.58, p.826-833, 1998.
- Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ.** Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (α (V) and α (5)) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, v.67, p.468-474, 2007.
- Guillemette C, Thabet M, Dompierre L and Sullivan R.** Some vasovasostomized men are characterized by low levels of P34H, an epididymal sperm protein. *J Androl*, v.20, p.214-219, 1999.
- Hao Y, Mathialagan N, Walters E, Mao J, Lai L, Becker D, Li D, Critser J, Prather RS.** Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod*, v.75, p.726-733, 2006.
- Hiron M, Harshan LP, Singh A, Arangasamy MR, Ansari Kumar S.** Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.93, p.124-133, 2006.
- Howes EA, Hurst S, Laslop A, Jones R.** Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, v.4, p.673-681, 1998.
- Ibrahim NM, Gilbert GR, Loseth KJ, Crabo BG.** Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *J Androl*, v.21, p.887-894, 2000.
- Iwamoto T, Hiroaki H, Furuichi Y, Wada K, Satoh M, Osada T, Gagnon C.** Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Lett*, v.368, p.420-424, 1995.
- Jenne DE, Lowin B, Peits MC, Bottcher A, Schimitz G, Tschopp J.** Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-1 in human plasma. *J Biol Chem*, v.266, p.11030-11036, 1991.
- Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Wald VB, Horn AP, Mattos RC.** BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology* v.63, p.2053-2062, 2005.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA.** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v.49, p.1202-1207, 1993.
- Lamontagne N, Légaré C, Gaudreault G, Sullivan R.** Identification and characterization of P31m, a novel sperm protein in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Mol Reprod Dev*, v.59, p.431-441, 2001.
- Lenz RW, Ball GD, Loochse JK, First NL, Ax RL.** Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.28, p.683-685, 1983.
- Lenz RW, Martin JL, Bellin ME, and Ax RL.** Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. *J Dairy Sci*, v.71, p.1073, 1988.
- Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD.** Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J Reprod Fertil*, v.97, p.75-81, 1993.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L.** The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod*, v.50, p.27-37, 1994.
- Manjunath P, Sairam MR.** Purification and biochemical characterization of three major acid proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J*, v.3, p.685-692, 1987.
- Manjunath P, Sairam MR, Uma J.** Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep*, v.3, p.231-238, 1987.
- Manjunath P, Therien I.** Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v.53, p.109-119, 2002.
- Marks JL, Ax RL.** Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. *J Dairy Sci*, v.68, p.2078-2082, 1985.
- McCauley TC, Bellin ME, Ax RL.** Localization of a heparin binding protein to distinct regions of bovine sperm. *J Anim Sci*, v.74, p.336-341, 1996.
- McCauley TC, Zhang HM, Bellin ME, Ax RL.** Identification of a heparin binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Mol Reprod Dev*, v.58, p.336-341, 2001.
- Miller DJ, Winer MA, Ax RL.** Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*, v.42, p.899-915, 1990.
- Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ.** Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.214-222, 2007.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ.** Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl*, v.27, p.201-211, 2006a.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ.** Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J Androl*, v.27, p.534-541, 2006b.

- Moreau R, Thérien I, Lazure C, Manjunath P.** Type II domains of BSP-A1/A2 proteins:: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. *Biochem Biophys Res Commun*, v.246, p.148-154, 1998.
- Nass SJ, Miller DJ, Winer MA, Ax RL.** Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol Reprod Dev*, v.25, p.237-246, 1990.
- Palmer DJ, Christie DL.** Identification of molecular aggregates containing glycoproteins III, J, K (carboxypeptidase H), and H (Kex2-related proteases) in soluble and membrane fractions of adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem*, v.267, p.19806-19812, 1992.
- Pankhurst JG, Bennet CA, Easterbrook-Smith SB.** Characterization of the heparin-binding properties of humen clusterin. *Biochemistry*, v.7, p.4823-4830, 1998.
- Parent S, Lefièvre L, Brindle Y and Sullivan R.** Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Mol Reprod Dev*, v.52, p.57-65, 1999.
- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E.** Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem*, v.242, p.636-640, 1996.
- Riffo M, Párraga M.** Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. *J Exp Zool*, v.79, p.81-88, 1997.
- Robert M, Gagnon C.** Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell Mol Life Sci*, v.55, p.944-960, 1999.
- Romero A, Romao MJ, Varela PF, Kolln I, Dias JM, Carvalho AL, Sanz L, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ.** The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat Struct Biol*, v.4, p.783-788, 1997.
- Roncoletta M, Morani ESC, Esper CR, Barnabé VH, Franceschini PH.** Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.77-87, 2006.
- Ronkko S, Lahtinen R, Vanha-Perttula T.** Phospholipases A2 in the reproductive system of the bull. *Int J Biochem*, v.23, p.595-603, 1991.
- Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Schmid ER, Amselgruber W, Sinowatz F, Ehrhard M, Töpfer-Petersen E.** The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Lett*, v.300, p.213-218, 1992.
- Schöneck C, Braun J, Einspanier R.** Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein a SFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenol.*, v.45, n.3, p.633-642, 1996.
- Soubeyrand S, Khadir A, Brindle Y, Manjunath P.** Purification of a novel phospholipase A(2) from bovine seminal plasma. *J Biol Chem*; v.272, p.222-227, 1997.
- Souza CE, Moura AA, Monaco E, Killian GJ.** Binding patterns of bovine seminal plasma proteins BSP A1/A2, BSP 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci*, v.105, p.72-89, 2008.
- Souza FF, Martins MIM, Fernandes CES, Ribolla PEM, Lopes MD.** Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology*, v.66, p.1606-1609, 2006.
- Sullivan R, Bleau G.** Interaction of isolated components from mammalian sperm and egg. *Gametes Res*, v.12, p.101-116, 1985.
- Sylvester C, Morales R, Oko R, Griswold MD.** Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biol Reprod*, v.45, p.195-207, 1991.
- Tedeschi G, Oungre E, Mortarino M, Negri A, Maffeo G, Ronchi S.** Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur J Biochem*, v.267, p.6175-6179, 2000.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P.** Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, v.59, p.768-776, 1999.
- Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P.** Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, v.57, p.1080-1088, 1998.
- Tokugawa Y, Kunishige I, Kubota Y, Shimoya K, Nobunaga T, Kimura T, Saji F, Murata Y, Eguchi N, Oda H, Urade Y, Hayaishi O.** Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. *Biol Reprod*, v.58, p.600-607, 1998.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostálová Z, Sanz L, Calvete JJ.** Spermadhesins: a new protein family: facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v.30, p.217-224, 1998.
- Ujihara M, Urade Y, Eguchi N, Hayashi H, Ikai K, Hayaishi O.** Prostaglandin D₂ formation and characterization of its synthetases in various tissues of adult rats. *Arch Biochem Biophys*, v.260, p.521-531, 1988.
- Varela PF, Romero A, Sanz L, Romao MJ, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ.** The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. *J Mol Biol*, v.274, p.635-649, 1997.
- Villemure M, Lazure C, Manjunath P.** Isolation and characterization of gelatin binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol*, v1, p.39, 2003.
- Vinatier D.** Integrins and reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.59, p.71-81, 1995.
- Wempe F, Einspanier R, Scheit KH.** Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, v.183, p.232-237.



1992.

Yuan YY, Chen WC, Shi QX, Mao LM, Yu Q, Fang X, Roldan ERS. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod*, v.68, p.904-913, 2003.
