

Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino

Seminal plasma proteins related to bovine semen freezability

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

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

E-mail: ines.jobim@ufrgs.br

Resumo

A tecnologia da criopreservação tem apresentado desenvolvimento notório, tanto no melhoramento da qualidade como na fertilidade do sêmen após o processamento. Apesar dos progressos alcançados com as técnicas da criopreservação do sêmen, ainda são obtidas perdas em torno de 50% de espermatozoides viáveis durante o processo (Watson, 2000). Os indivíduos podem ser classificados como produtores de sêmen de alta e baixa congelabilidade, dependendo das características estruturais da membrana, o que é geneticamente determinado, predispondo à sobrevivência ao estresse da criopreservação (WATSON, 2000). Várias proteínas do plasma seminal bovino têm influência na congelabilidade do sêmen. Roncoletta (1999), através da análise das proteínas do plasma seminal, verificaram três polipeptídeos (45, 24 e 10,8 kDa) com densidade óptica superior nas amostras de reprodutores de melhor congelabilidade do sêmen. Outras proteínas também foram relacionadas à alta congelabilidade do sêmen: a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), a clusterina, a albumina e a osteopontina (OPN); podendo assim, ser indicadas como marcadores. Também foram indicadas mais duas bandas protéicas (15-16 kDa, pI 4,7-5,2 e relacionadas à alta congelabilidade do sêmen, porém que não foram identificadas no estudo, mas que pelo peso molecular e ponto isoelétrico aproximado poderiam corresponder às proteínas BSP A1/A2 (15-16 kDa, pI 4,7-5,2) ou BSP A3 (13-14 kDa, pI 6,0-6,5) (JOBIM et al., 2004). Outros estudos indicam ainda as proteínas P25b e as proteínas anticongelação (AFPs), como proteínas relacionadas a congelabilidade do sêmen. Apesar dos progressos no conhecimento das proteínas relacionadas à criopreservação, ainda encontramos resultados bastante contraditórios e por vezes, a ausência do conhecimento da forma de proteção conferida por determinadas proteínas. Entretanto, não resta dúvida que a modificação ou mesmo a perda de proteínas do plasma seminal e da superfície espermática parecem fazer parte do mecanismo da crioinjúria que levam a menor fertilidade do sêmen congelado.

Palavras chave: marcadores de congelabilidade, proteínas, plasma seminal, congelação do sêmen bovino.

Abstract

Cryopreservation techniques has shown remarkable development, both in improving the quality and the fertility of semen after processing. Despite these progress, losses are around 50% of viable sperm during the process (Watson, 2000). Individuals can be classified as producers of high-and low semen. The structural characteristics of the membrane, which is genetically determined, predisposes the survival of the stress of cryopreservation (Watson, 2000). Several proteins of bovine seminal plasma influence on semen freezability. Roncoletta (1999), analysing seminal plasma proteins, find three polipeptídeos (45, 24 and 10.8 kDa) with higher optical density in samples of the bulls with high freezability semen. Other proteins were also highly related to the frozen semen: the acid bovine seminal fluid (aSFP), the clusterin, the albumin and osteopontin (OPN) can be shown as semen freezability markers. Also two protein bands, (15-16 kDa, pI 4,7-5,2) are related to the high semen freezability, based in molecular weight and isoelectric point could correspond to the protein BSP A1/A2 (15-16 kDa, pI 4,7-5,2) or BSP A3 (13-14 kDa, pI 6,0-6,5) (JOBIM, et al 2004). Other studies also indicate the proteins P25b as antifreeze protein (AFPs) related to semen freezability. Despite progress in understanding proteins related to cryopreservation, the results are still contradictory and sometimes, a lack of knowledge of protection provided by certain proteins. There is no doubt that the modification or even the loss of proteins of seminal plasma and sperm surface appear to be part of the mechanism of cryoinjury leading to lower fertility of frozen semen.

Keywords: freezability markers, proteins, seminal plasma, freezing of bovine semen.

Introdução

A tecnologia da criopreservação tem apresentado desenvolvimento notório, tanto no melhoramento da qualidade como na fertilidade do sêmen após o processamento. Apesar dos progressos alcançados com as técnicas da criopreservação do sêmen, ainda são obtidas perdas em torno de 50% de espermatozoides viáveis durante o processo (Watson, 2000).

Durante o processo da criopreservação e/ou descongelamento, ocorrem danos: formação de cristais de gelo intracelulares; aumento da concentração intra-celular de solutos; e modificações correlacionadas, resultantes da desidratação celular durante a congelação. A lesão celular pode ser causada diretamente, afetando estruturas celulares (ruptura de membranas), ou indiretamente, alterando as funções celulares através do processo metabólico (Holt, 2000). Entre os danos ocorridos na célula durante o processo da criopreservação também estão incluídas injúrias e perdas de proteínas da superfície espermática (Lasso *et al.*, 1994). Estas observações encontram suporte nos estudos de Hammerstedt e Graham (1992), Ollero *et al.* (1998), Nauc e Manjunath, (2000). Ainda neste contexto, Ollero *et al.* (1998) observaram a perda de quatro bandas protéicas da membrana espermática das amostras do ejaculado de quatro reprodutores (35, 68, 100 e 245 kDa) quando comparado ao sêmen fresco dos mesmos reprodutores. A diferença entre a composição da membrana espermática do sêmen fresco e congelado pode ser a base molecular para as diferenças encontradas na fertilidade do sêmen criopreservado (Ollero *et al.*, 1998).

Apesar do conhecimento das modificações na superfície espermática que ocorrem na criopreservação, as relações entre estas injúrias e a diminuição da fertilidade são pouco conhecidas (Lessard *et al.*, 2000).

Os indivíduos podem ser classificados como produtores de sêmen de alta e baixa congelabilidade, dependendo das características estruturais da membrana, o que é geneticamente determinado, predispondo à sobrevivência ao estresse da criopreservação (Watson, 2000).

Várias proteínas do plasma seminal bovino têm influência na congelabilidade do sêmen. Roncoletta (1999), através da análise das proteínas do plasma seminal por eletroforese unidimensional, verificaram três polipeptídeos (45, 24 e 10,8 kDa) com densidade óptica superior nas amostras de reprodutores de melhor congelabilidade do sêmen. Posteriormente, Roncoletta *et al.* (2000) identificaram, através de imunodeteção, a proteína de 24 kDa, como sendo a prostaglandina D sintase tipo lipocalina, essa proteína apresentou quantidade superior no plasma seminal dos reprodutores com melhor congelabilidade do sêmen (Roncoletta *et al.*, 2000).

Através de eletroforese bidimensional, também foram detectadas diferenças no perfil protéico do plasma seminal de reprodutores bovinos de alta e baixa congelabilidade do sêmen. Foram utilizados 16 reprodutores adultos, doadores de sêmen, pertencentes às espécies *Bos taurus taurus* (9) e *Bos taurus indicus* (7), subdivididos em dois grupos, de acordo com o grau de congelabilidade do sêmen. A formação dos grupos dos reprodutores, de acordo com a congelabilidade do sêmen, foi baseada no histórico de produção da central de inseminação artificial de 2 anos (Jobim, 2001, Jobim *et al.*, 2004).

A proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), a clusterina, a albumina e a osteopontina (OPN), foram as proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a alta congelabilidade do sêmen; podendo assim, ser indicadas como marcadores. Também foram indicadas mais duas bandas protéicas (15-16 kDa, pI 4,7-5,2 e relacionadas à alta congelabilidade do sêmen, porém que não foram identificadas no estudo, mas que pelo peso molecular e ponto isoelétrico aproximado poderiam corresponder às proteínas BSP A1/A2 (15-16 kDa, pI 4,7-5,2) ou BSP A3 (13-14 kDa, pI 6,0-6,5; Jobim *et al.*, 2004).

No estudo de Jobim *et al.* (2004), as amostras de plasma seminal dos reprodutores de baixa congelabilidade apresentaram uma banda protéica (25-26 kDa; pI 6,0-6,5) com densidade óptica superior às amostras dos reprodutores de alta congelabilidade, estando esta proteína presente em 100% das amostras dos reprodutores de baixa congelabilidade e somente em 30% das amostras do plasma seminal de reprodutores considerados de alta congelabilidade do sêmen. Esta banda protéica foi sugerida como indicativo da baixa congelabilidade do sêmen bovino. Embora não tenha sido identificada, esta proteína pelo peso molecular e ponto isoelétrico aproximado poderia corresponder à prostaglandina D sintase tipo lipocalina.

Proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP)

Esta proteína é secretada pelas vesículas seminais (Einspanier *et al.*, 1991 e Wempe *et al.*, 1992), ampolas e epidídimo, mas não pelo testículo e outros tecidos do aparelho reprodutor do touro (Wempe *et al.*, 1992). A aSFP possui 50% da seqüência de aminoácidos idêntica à dos polipeptídeos das espermidinas do suíno (Einspanier *et al.*, 1994), mas com características biológicas diferentes: 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* (Schöneck *et al.*, 1996). O estresse sofrido no processo da criopreservação tem como resultados a sobrevivência, o prejuízo da função ou a morte da célula espermática (Holt, 2000). O peróxido é produzido e liberado pelas membranas das células mortas, em detrimento dos espermatozóides vivos (Shannon, 1978). Conseqüentemente, a presença da aSFP, quantitativamente superior nos reprodutores de alta congelabilidade do sêmen, pode ser explicada pelo poder de preservação da membrana do espermatozóide contra a peroxidação, conferido por esta proteína (Jobim *et al.*, 2004).

Clusterina

A clusterina esteve presente em 90% das amostras de plasma seminal dos reprodutores de alta congelabilidade e em apenas 16,66% das amostras do grupo considerado de baixa congelabilidade do sêmen (Jobim *et al.*, 2004). A clusterina é uma glicoproteína de peso molecular de 25,35 kDa e pI de 5,54, 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), 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). Em bovinos, taxas de imunodeteção positiva de clusterina nos espermatozoides foram inversamente correlacionadas com taxas de concepção (Ibrahim *et al.*, 2000). Tendo em vista sua localização na membrana espermática e seu papel no transporte e redistribuição de lipídeos, esta proteína poderia apresentar funções biológicas semelhantes às da BSP na proteção da função da membrana espermática, no processo da criopreservação do sêmen (Jobim *et al.*, 2004).

Albumina

Uma banda protéica de 66 kDa, pI 5,4, foi imunoidentificada, no experimento de Jobim (2001), como sendo a albumina, e apresentou densidade óptica superior nas amostras dos reprodutores de alta congelabilidade do sêmen.

Foi observado que a albumina sérica bovina, quando adicionada a espermatozoides epididimários incubados com o plasma, epididimário ou seminal, homólogo, estimulou a motilidade espermática (Dott *et al.*, 1979). Outros estudos verificaram que a albumina sérica era benéfica à motilidade no sêmen de suíno, ovino, eqüino e de coelho, mas que tinha pouco efeito na motilidade espermática do bovino (Baas *et al.*, 1983). Neste estudo, embora se tenha observado o efeito da albumina do plasma seminal na congelabilidade do sêmen e não da adição da albumina sérica, a maior concentração desta proteína nos reprodutores de alta congelabilidade do sêmen está de acordo com os dados encontrados por Dott *et al.* (1979), quando referem um aumento na motilidade espermática atribuído à adição da albumina.

A membrana espermática é a principal responsável pela regulação da função espermática (Garcia-Lopez *et al.*, 1996). Componentes específicos do plasma seminal adsorvidos à superfície da membrana do espermatozoide no trânsito epididimário e na ejaculação (Metz *et al.*, 1990; Desnoyers e Manjunath, 1992; Amman *et al.*, 1993) modulam a capacitação espermática (Eng e Oliphant, 1978; Miller *et al.*, 1990; Manjunath *et al.*, 1994). O processo da capacitação está associado a profundas alterações na membrana do espermatozoide, incluindo o efluxo do colesterol da membrana plasmática (Visconti *et al.*, 1998). A albumina, presente no trato genital da fêmea, promove o efluxo do colesterol e de outros fosfolipídios de membrana que ocorrem na capacitação (Davis *et al.*, 1979; Visconti *et al.*, 1998; Osheroff *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001). O mesmo papel é atribuído às proteínas BSP A1/A2 (PDC-109) do plasma seminal bovino (Thérien *et al.*, 1999). Conseqüentemente, a maior quantidade de albumina no plasma seminal dos reprodutores de alta congelabilidade do sêmen, verificada no estudo, pode estar relacionada à capacidade da albumina em participar de modificações de permeabilidade da membrana espermática (Jobim, 2001; Jobim *et al.*, 2002).

Osteopontina (OPN)

A proteína imunoidentificada como a osteopontina no estudo de Jobim (2001) também foi prevalente no plasma seminal dos touros de alta congelabilidade.

A osteopontina é uma glicoproteína ácida, inicialmente identificada e isolada da matriz óssea bovina (Franzen e Heinegard, 1985). Foi identificada nas células de Sertoli, epitélio seminífero e cauda do espermatozoide em ratos (Siiteri *et al.*, 1995). O anti-soro contra a osteopontina humana assim como o anti-soro preparado contra a osteopontina purificada do plasma seminal bovino, reagiram com a proteína no plasma seminal e nos fluidos das vesículas seminais e ampolas, levando à conclusão que as fontes primárias da osteopontina no touro são as vesículas seminais e as ampolas (Cancel *et al.*, 1999).

A natureza ácida da osteopontina foi atribuída à grande quantidade de ácido aspártico e ácido glutâmico (Franzen e Heinegard, 1985). A seqüência N-terminal SSEEK da OPN é considerada como substrato para quinases intracelulares que fosforilam (Pinna *et al.*, 1979), e a seqüência GRGDS está envolvida na adesão celular através de receptores celulares da família integrina (Craig *et al.*, 1989). Os receptores para integrina parecem ter um papel na ligação espermatozoide-oócito, na pré-implantação e na implantação (Vinatier, 1995).

Foram identificados dois sítios potenciais de ligação à heparina no cDNA da osteopontina do rato (Patarca *et al.*, 1993). O plasma seminal bovino contém proteínas de ligação à heparina que, por sua vez, ligam-se ao espermatozoide e regulam a capacitação mediada por heparina (Miller *et al.*, 1990). Também foram

identificados dois sítios potenciais de ligação ao Ca^{2+} em osteopontina de diversas espécies (Prince, 1989).

A osteopontina foi classificada como uma citoquina (Patarca *et al.*, 1993). As citoquinas são descritas como proteínas e peptídeos solúveis que podem modular a função celular, usualmente através de efeitos mediados por receptores (Patarca *et al.*, 1993).

Tendo em vista o papel da osteopontina na adesão celular através de receptores celulares da família integrina, sugere-se que a relação desta proteína com a congelabilidade do sêmen pode ser atribuída à modulação da função celular da membrana plasmática do espermatozóide, contribuindo, assim, para a proteção da mesma no processo da criopreservação do sêmen (Jobim, 2001, Jobim *et al.*, 2002).

BSP

Com base no peso molecular e pI aproximado, a banda protéica de peso molecular entre 15 a 17 kDa e pI entre 4,5 a 5,5, pode corresponder a BSP A1/A2 apresentou densidade óptica superior nos reprodutores de alta congelabilidade (Jobim, 2001, Jobim *et al.*, 2004).

A BSP A1/A2 é a principal proteína de ligação à heparina do plasma seminal bovino, ligando-se especificamente aos colina-fosfolipídeos do espermatozóide no momento da ejaculação, mediando a capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolipídeos (Thérien *et al.*, 1999). Foi observada uma diminuição significativa (70-80%) na concentração das proteínas BSP ligadas à membrana espermática depois da criopreservação do sêmen, o que indica a ocorrência de modificações na membrana do espermatozóide, durante a congelamento, as quais podem alterar as propriedades da membrana, levando à capacitação prematura do espermatozóide após o descongelamento (Nauc e Manjunath, 2000). Desta forma, pode-se supor que a maior quantidade desta proteína no plasma seminal, como foi observado nas amostras dos reprodutores de alta congelabilidade neste estudo, poderia conferir maior preservação das propriedades da membrana espermática durante o processo da congelamento do sêmen.

Em estudos recentes, o grupo de Manjunath elucidou o mecanismo de atuação das BSP na criopreservação do sêmen: Na ejaculação, as proteínas BSP secretadas pelas vesículas seminais ligam-se a membrana espermática (Desnoyers e Manjunath, 1992; Manjunath *et al.*, 1994) e induzem o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana (Therien *et al.*, 1998, 1999). Se o sêmen não é diluído, é continuamente exposto a altas concentrações das proteínas BSP, conseqüentemente a remoção de lipídios é contínua, resultando na diminuição da resistência espermática ao choque térmico e ao congelamento (Manjunath *et al.*, 2007).

Foi observado que as BSP são proteínas de ligação dos colina-fosfolipídeos da membrana espermática e que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL; responsáveis pela proteção espermática conferida pela gema de ovo presente nos diluentes) contêm estes lipídios (Manjunath *et al.*, 2002). As proteínas BSP ligam-se ao LDL de forma rápida e saturável (uma molécula de LDL pode ligar 240-555 moléculas de BSP), e mesmo depois da congelamento as proteínas BSP ainda estão associadas com o LDL da gema de ovo. Esta interação parece ter efeitos significativos na preservação da função espermática (Bergeron *et al.*, 2004).

P25b

Estudando alterações de proteínas da superfície espermática no sêmen criopreservado de oito touros de alta e baixa fertilidade (baseado em dados de não retorno de inseminação artificial) Lessard *et al.* (2000) observaram que após 28 dias de preservação do sêmen em nitrogênio líquido a proteína P25b apresentava uma diminuição significativa de sua concentração quando comparada ao sêmen fresco. Entretanto, esta diminuição ocorreu a partir do 5º dia, quando o sêmen foi diluído em meio contendo gema de ovo, e depois de 14 dias de estocagem quando o diluente continha leite.

P25b é uma proteína da superfície espermática adquirida pela célula, durante o trânsito epididimário (Sullivan e Robitaille 1989). Esta proteína está envolvida na interação de gametas, atuando como molécula de ligação à zona pelúcida (Bérubé e Sullivan, 1994; Boué *et al.*, 1994). A P25b foi considerada como marcador da fertilidade bovina (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. Portanto, a perda desta proteína que ocorre no processo da criopreservação pode ser suficiente para diminuir a fertilidade do sêmen bovino congelado. A perda de proteínas da superfície do espermatozóide relacionadas à função espermática parece fazer parte do mecanismo da crioinjúria que leva a menor fertilidade do sêmen congelado, e parece que no bovino, a P25b é uma destas proteínas (Lessard *et al.*, 2000).

Proteínas anticongelação (AFPs)

Outras proteínas surgiram, talvez, como perspectiva de adição ao sêmen congelado, na tentativa de minimizar as injúrias da criopreservação.

Foi descoberto um peixe da Antártica que podia resistir à congelamento, e este efeito foi atribuído à presença de proteínas específicas, que posteriormente foram denominadas de proteínas anticongelação (Devries e

Wohlschlag, 1969). As proteínas anticongelação (AFPs) e as glicoproteínas anticongelação (AFGPs) protegem as células na criopreservação, através da modificação na forma dos cristais de gelo (Ishiguro e Rubinsky, 1994; Chapsky e Rubinsky, 1997), previnem a recristalização (Knight *et al.*, 1984) além de protegerem a membrana plasmática nas baixas temperaturas (Rubinsky *et al.*, 1990, 1991). Quatro diferentes AFPs e também AFGPs foram identificadas (AFPI, AFPII, AFPIII, AFPIV e AFGP), porém somente três formas destas proteínas estão disponíveis comercialmente (AFPI, AFP III e AFPGP).

Estudos demonstraram o efeito da adição das AFPs no sêmen criopreservado: No chimpanzé (Younis *et al.*, 1998) e no ovino (Payne *et al.*, 1994), proporcionaram um aumento na porcentagem de espermatozoides móveis pós-descongelamento. Entretanto, no sêmen de camundongo, foi observada uma relação inversa entre as concentrações de AFPs e a porcentagem de espermatozoides vivos pós-descongelamento (Koshimoto e Mazur, 2002).

Prathalingam *et al.* (2006) testaram o efeito da adição das AFPI, AFPIII e AFGP em quatro concentrações (0,1; 1; 10 e 100 µg/ml) no diluente do sêmen bovino para congelamento. AFPI, AFPIII e AFGP não afetaram significativamente a proporção de células viáveis, nem a integridade do acrossoma pós-descongelamento. Entretanto foi observado um aumento na resistência osmótica quando o sêmen foi tratado com AFPI nas concentrações de 0,1; 1 e 10 µg/ml. Portanto, a adição destas proteínas ao sêmen que será submetido a criopreservação, ainda apresentam resultados contraditórios.

Conclusões e perspectivas futuras

Apesar dos progressos no conhecimento das proteínas relacionadas à criopreservação, ainda encontramos resultados bastante contraditórios e por vezes, a ausência do conhecimento da forma de proteção conferida por determinadas proteínas. Entretanto, não resta dúvida que a modificação ou mesmo a perda de proteínas do plasma seminal e da superfície espermática parecem fazer parte do mecanismo da crioinjúria que levam a menor fertilidade do sêmen congelado.

As perspectivas futuras parecem estar focadas na adição de proteínas relacionadas à alta congelabilidade ou fertilidade ao sêmen congelado, porém, para que os objetivos sejam alcançados, um longo caminho na purificação destas proteínas deve ser percorrido.

Referências

- Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DNH.** The epididymis and sperm maturation – a perspective. *Reprod Fertil Dev*, v.5. p.361-381, 1993.
- Baas JW, Molan PC, Shannon P.** Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.68, p.275-280, 1983.
- 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.
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and reverts lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*, v.70, p.708-717, 2004.
- Berube B, Sullivan R.** Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biol Reprod*, v.51, p.1255-1263, 1994.
- Boué F, Berube B, De Lamirande E, Gagnon C, Sullivan R.** Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biol Reprod*, v.51, p.577-587, 1994.
- 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.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ.** Osteopontin localization in the holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod*, v.60, p.454-460, 1999.
- Chapsky L, Rubinsky B.** Kinetics of antifreeze protein-induced ice growth inhibition. *FEBS Lett*, v.412, p.241-244, 1997.
- 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.
- Davis BK, Byrne R, Hungund B.** Studies on the mechanism of capacitation, II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation. *Biochim Biophys Acta*, v.558, p.257-266, 1979.
- Desnoyers L, Manjunath P.** Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem*, v.267, p.10149-10155, 1992.
- DeVries AL, Wohlschlag DE.** Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, v.163, p.1074-1075, 1969.
- 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. *BiolChem Hoppe Seyler*, v.375, p.457-461, 1994.

- Dott HM, Harrison RAP, Foster GCA.** The maintenance of motility and the surfaces properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil*, v.55, p.113-124, 1979.
- Einspanier R, Einspanier A, Wempe F, Scheit KH.** Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem Biophys Res Commun*, v.179, p.1006-1010, 1991.
- Einspanier R, Krause I, Tofper-Petersen E, Klostermeyer H, Karg H.** Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. *FEBS Lett*, v.344, p.61-64, 1994.
- Eng LE, Oliphant G.** Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol Reprod*, v.19, p.1083-1084, 1978.
- Franzen A, Heinegard D.** Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. *Biochem J*, v.232, p.715-724, 1985.
- García-López N, Ollero M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T.** Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B Biomed Appl*, v.17, p.137-43, 1996
- 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.
- Hammerstedt RH, Graham JK.** Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v.29, p.26-38, 1992.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.
- 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.
- Ishiguro H, Rubinsky B.** Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology*, v.31, p.483-500, 1994.
- Jenne DE, Lowin B, Peitsch 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.** *Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino.* 2001. 156f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2001.
- Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Cimarosti HI, Mattos RC.** Albumina e osteopontina - proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen 1. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.296-305, 2002.
- Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC.** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v.61, p.255-266, 2004.
- Knight CA, DeVries AL, Oolman LD.** Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature*, v.308, p.295-296, 1984.
- Koshimoto C, Mazur P.** Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*, v.45, p.49-59, 2002.
- Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT.** Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl*, v.15, p.255-65, 1994.
- Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R.** Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl*, v.21, p.700-707, 2000.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J.** Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Spermatology*, v.65, p.217-228, 2007.
- 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, 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.
- Metz KW, Berger T, Clegg ED.** Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.34, p.691-700, 1990.
- 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.
- Nauc V, Manjunath P.** Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod*, v.63, p.1058-1066, 2000.
- Ollero M, Bescós O, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T.** Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology*, v.49, p.547-55, 1998.
- Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS.** Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated

- up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod*, v.5, p.1017-1026, 1999.
- 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 human clusterin. *Biochemistry*, v.7, p.4823-4830, 1998.
- Payne SR, Oliver JE, Upreti GC.** Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, v.31, p.180-184, 1994.
- Prathalingam NS, Holt WV, Revell SG, Mirczuk S, Fleck RA, Watson PF.** Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, v.66, p.1894-1900, 2006.
- Parent S, Lefèvre 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.
- Patarca R, Saavedra RA, Cantor H.** Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol*, v.13, p.225-246, 1993.
- Pinna LA, Donella-Deana A, Meggio F.** Structural features determining the site specificity of rat liver cAMP-independent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, v.87, p.114-120, 1979.
- Prince CW.** Secondary structure predictions for rat osteopontin. *Connect Tissue Res*, v.21, p.15-20, 1989.
- Roncoletta M.** Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal bovino relacionados com a congelabilidade do sêmen de touros. 1999. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.
- Roncoletta M, Morani ESC, Franceschini PH, Ramos PRR.** Caracterização da proteína 26 kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.28, p.323, 2000.
- Rubinsky B, Arav A, Fletcher GL.** Hypothermic protection - a fundamental property of “antifreeze” proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, v.180, p.566-571, 1991.
- Rubinsky B, Arav A, Mattioli M, Devries AL.** The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures. *Biochem Biophys Res Commun*, v.173, p.1369-1374, 1990.
- 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. *Theriogenology*, v.45, p.633-642, 1996.
- Siiteri JE, Ensrud KM, Moore A, Hamilton DW.** Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol Reprod Dev*, v.40, p.16-28, 1995.
- Shannon P.** Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. *J Reprod Fertil*, v.54, p.519-527, 1978.
- Sullivan R, Robitaille G.** The heterogeneity of epididymal spermatozoa in the hamster. *Gamete Res*, v.24, p.229-236, 1989.
- 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.
- 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.
- Vinatier D.** Integrins and reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.59, p.71-81, 1995.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning XP, Fornes M, Kopf GS.** The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, v.19, p.242-248, 1998.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.
- Wempe F, Einspanier R, Scheit KH.** Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal protein. *Biochem Biophys Res Commun*, v.183, p.232-237, 1992.
- Wu CJ, Stojanov T, Chami O, Ishii S, Shimuzu T, Lia, O'Neill C.** Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem*, v.276, p.26962-26968, 2001.
- Younis AI, Rooks B, Khan S, Gould KG.** The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. *J Androl*, v.19, p.207-214, 1998.