



Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade

Seminal plasma proteins, sperm functions and molecular markers of fertility

A.A. Moura¹, C.R. Andrade, C.E.A. Souza, J.P.A. Rêgo, J.A.M. Martins, R.V. Oliveira, E.B.S. Menezes

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

¹Autor para correspondência: amoura@ufc.br, arlindo.moura@gmail.com

Resumo

Componentes moleculares dos espermatozoides, ou dos meios que os cercam, influenciam a capacidade fecundante destas células. Dado tal conceito, proteínas do plasma seminal modulam cruciais funções e processos da reprodução, como a motilidade e capacitação espermática, proteção celular, reação acrossômica e fertilização. As relações empíricas entre índices de fertilidade e proteínas seminais em determinadas espécies indicam que estas proteínas têm o potencial de serem identificadas como marcadores da capacidade reprodutiva do macho.

Palavras-chave: espermatozoide, fertilidade, plasma seminal, proteínas, proteômica.

Abstract

Molecular components of the sperm, or from the media that surround them, influence the fertilizing capacity of such cells. Given this concept, proteins of the seminal plasma modulate crucial functions and events of reproduction, such as sperm motility and capacitation, cell protection, acrosome reaction and fertilization. Empirical associations between some proteins and fertility indexes in certain species indicate that these proteins can be potentially identified as molecular markers of the male reproductive status.

Keywords: *fertility, sperm, seminal plasma, seminal proteins, proteomics.*

Introdução

Em linhas gerais, considera-se que a taxa de não retorno ao cio associada a cada reprodutor é um dos principais indicadores do seu desempenho reprodutivo, mas esta informação ou não se encontra disponível para vários rebanhos ou torna-se disponível somente quando o animal já se encontra em fase de produção comercial de sêmen. Portanto, a expectativa de se dispor de marcadores que auxiliem a indicação da fertilidade potencial do animal tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas. Parâmetros como motilidade e morfologia espermática são usados para avaliar aspectos da reprodução dos machos, mas ainda apresentam limitada relação com os índices de fertilidade *in vivo* (Killian et al., 1993; Moura, 2005; Moura et al., 2006a, b, 2010). Em função desta abordagem sobre a fertilidade dos machos, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de identificar marcadores moleculares de processos reprodutivos em animais de produção, tais como avaliação da estrutura do DNA e identificação de mRNAs dos espermatozoides, proteínas de membranas e da célula como um todo, além das proteínas expressas nos fluidos reprodutivos. Todas estas linhas de trabalho pressupõem a hipótese de que componentes moleculares dos espermatozoides, ou dos meios que os cercam, influenciam a capacidade fecundante destas células, e as diferenças de fertilidade observadas entre os animais, não explicadas pelos testes de rotina para avaliação da qualidade do sêmen, relacionam-se a tais componentes.

Considerando-se que a função espermática, após a espermatogênese, é modulada de forma significativa por alterações pós-traducionais de proteínas celulares, a análise proteômica dos fluidos reprodutivos fornece informações importantes para a compreensão dos mecanismos que determinam a capacidade fecundante dos gametas masculinos e, conseqüentemente, dos reprodutores. Assim, a presente revisão aborda funções dos principais grupamentos de proteínas seminais de animais de produção e associações delas com parâmetros do sêmen ou índices de fertilidade.

Proteínas envolvidas em eventos associados à proteção das células espermáticas

O plasma seminal contém proteínas que participam de processos relacionados à proteção dos espermatozoides (Kraus et al., 2005) durante o trânsito epididimário e o armazenamento na cauda deste órgão (Hinton et al., 1995), por ocasião da ejaculação e no trato reprodutor da fêmea. Apesar de o processo de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenhar função importante na fisiologia do espermatozoide (Macleod, 1943), um desequilíbrio nessa formação pode levar ao estresse oxidativo com conseqüentes distúrbios funcionais do espermatozoide, por meio de mecanismos como peroxidação lipídica

(Aitken et al., 1993), redução da atividade de enzimas reguladoras do influxo de cálcio na membrana (Ohta et al., 1989) e perda de ATP (de Lamirande e Gagnon, 1992). Para combater a ação deletéria das ROS sobre os espermatozoides, o epidídimo secreta enzimas antioxidantes (Hinton et al., 1996), dentre as quais glutatona S-transferase, tioredoxina peroxidase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase (Alvarez e Storey, 1983; Jeulin et al., 1989; Fouchécourt et al., 2000; Dacheux et al., 2006). A glutatona peroxidase (GSHPx) constitui um dos principais meios enzimáticos de proteção espermática, estando presente no fluido epididimário e na membrana (Perry et al., 1992; Dacheux et al., 2005). A GSHPx possui um resíduo selenocisteína no sítio ativo que catalisa a redução de moléculas de peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1990), e o aumento da atividade dessa enzima, em sêmen de carneiros, tem sido associado a uma atividade antioxidante no fluido seminal, mantendo a viabilidade do espermatozoide (Casao et al., 2010). De forma semelhante, a proteína conhecida como *acidic seminal fluid protein* (aSFP), membro da família das espermadezinas e secretada pelas glândulas sexuais acessórias e epidídimo (Moura et al., 2007, 2010), também possui importante papel no controle do estresse oxidativo no trato reprodutor masculino.

Adicionalmente, quelantes metálicos presentes no plasma seminal, como a lactoferrina, protegem os espermatozoides dos danos da peroxidação lipídica (Ochsendorf, 1999). A lactoferrina atua sequestrando o ferro iônico (Nozaki et al., 2003) e possui a propriedade de adsorver-se aos espermatozoides, durante o trânsito epididimário (Jin et al., 1997) e no momento da ejaculação (Thaler et al., 1990), onde também atua como agente antimicrobiano e na regulação da expressão gênica.

A albumina seminal possui a capacidade de absorver peróxidos de lipídios, contribui com efeito protetor da membrana espermática (Alvarez e Storey, 1983 e apresenta correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais no ejaculado de bovinos (Elzanaty et al., 2007). Outra proteína com funções protetoras do espermatozoide é a clusterina, que atua como chaperona, solubilizando proteínas parcialmente desestruturadas e reduzindo a citotoxicidade da precipitação proteica induzida por estresses celulares (Humphreys et al., 1999). Algumas das funções da clusterina no epidídimo estão relacionadas à maturação espermática, ao transporte de lipídios (Tenniswood et al., 1992) e ao remodelamento da membrana espermática (Humphreys et al., 1999). A clusterina também tem sido associada à inibição da lise pelo sistema complemento presente no epidídimo e nas secreções uterinas (Ibrahim et al., 1999), o que auxilia a viabilidade do espermatozoide durante o trajeto no trato reprodutor feminino (Meri e Jarva, 2001). A correlação positiva entre clusterina do plasma seminal e a congelabilidade do sêmen sugere que esta proteína exerce efeito sobre o transporte e redistribuição de lipídios no plasmalema, o que reduziria os danos à membrana espermática durante a criopreservação (Jobim et al., 2004). Estudos também indicam que as quantidades de clusterina e albumina no fluido das glândulas sexuais acessórias de touros correlacionam-se com a capacidade fecundante de espermatozoides epididimário tratados com este fluido, *in vitro* (Souza et al., 2008).

Proteínas associadas à motilidade espermática

O plasma seminal possui componentes capazes de modular a motilidade dos espermatozoides (Baas et al., 1983), dentre os quais o sistema enzimático das calicreína-cininas. Nesse sistema, o cininogênio presente no plasma seminal atua como substrato específico da enzima calicreína (Fink et al., 1989), produzindo as cininas, que são os principais efetores no estímulo da motilidade espermática após a ejaculação (Schill et al., 1989). Estudos têm demonstrado correlações positivas entre o grau de atividade da calicreína no plasma seminal e a motilidade dos espermatozoides no ejaculado, e a adição de calicreína exógena apresenta efeito benéfico sobre a motilidade de espermatozoides (Somlev et al., 1996). Outro componente seminal relacionado ao sistema das calicreínas é a enzima conversora de angiotensina (ECA; Hohlbrugger et al., 1984), que catalisa a formação de angiotensina II e liga-se a receptores específicos nas peças intermediária e principal do espermatozoide, intensificando eventos relacionados com a motilidade (Vinson et al., 1996). A atividade da ECA no plasma seminal de carneiros correlaciona-se positivamente com a concentração espermática (Gatti et al., 2004) e também com a fertilidade deles (Métayer et al., 2001).

Proteínas envolvidas na capacitação espermática

Proteínas ligadoras de fosfolipídios, coletivamente denominadas de BSPs (*Binder of Sperm Proteins*), encontram-se presentes no plasma seminal de várias espécies, tais como bovinos, caprinos e ovinos (Villemure et al., 2003; Bergeron et al., 2005; Manjunath et al., 2009; Rego et al., 2010). Estas proteínas são secretadas pelas glândulas sexuais acessórias e representam em torno de 35% das proteínas totais sintetizadas no plasma seminal daquelas espécies (Moura et al., 2006a; Rego et al., 2010; Lima et al., 2011). As BSPs são compostas de peptídios de cadeia única e apresentam dois domínios semelhantes à fibronectina tipo II, característica que lhes confere a capacidade de ligação a fosfolipídios (Calvete et al., 1996). Estudos têm demonstrado que as BSPs ligam-se aos espermatozoides no momento da ejaculação, promovendo a remoção de fosfolipídios e colesterol (Thérien et al., 1998; 1999), o que resulta na diminuição da proporção colesterol:fosfolipídio, um dos requisitos à capacitação do espermatozoide. Além disso, estas proteínas permanecem ligadas à membrana espermática

durante o trajeto no trato reprodutor feminino (Souza et al., 2008) e, ao atingirem o oviduto, auxiliam na interação entre os espermatozoides e o epitélio do oviduto (Gwathmey et al., 2006). Estudos têm evidenciado que as BSPs correlacionam-se com índices de fertilidade de touros (*in vivo* e *in vitro*) e estas relações empíricas evidenciam que tais componentes, além de constituírem a principal categoria de proteínas do plasma seminal de ruminantes, também se apresentam como potenciais indicadores da reprodução dos machos.

Proteínas envolvidas na reação acrossômica, fertilização e desenvolvimento embrionário

A fosfolipase A₂ (PLA₂) seminal desempenha funções importantes na capacitação, na reação acrossômica e nas etapas iniciais da fertilização, incluindo a fusão entre espermatozoide e oócito (Soubeyrand et al., 1997; Pietrobon et al., 2005; Roldan e Shi, 2007). Esta enzima também pode exercer ação antimicrobiana no plasma seminal, e a expressão de PLA₂ nesse fluido de bovinos também apresenta correlação com a fertilidade (Moura et al., 2006a, Souza et al., 2008).

A habilidade dos espermatozoides de ligação à zona pelúcida, de penetração e fertilização do oócito é adquirida durante o trânsito epididimário (Amann e Hammerstedt, 1993; Töpfer-Petersen et al., 2000). As modificações ocorridas durante a maturação espermática ocorrem por meio da exposição sequencial e sincronizada destas células a diferentes componentes do fluido do epidídimo. A maior parte dessas modificações é induzida por novas proteínas presentes nesse fluido (Dacheux et al., 2005) ou por modificações de proteínas já existentes (Dacheux et al., 2006), criando novos sítios de ligação à estrutura oocitária ou exposição de sítios pré-existentes (Sullivan et al., 2005). Antes de o espermatozoide atingir o sítio de fertilização, durante o trânsito epididimário a membrana plasmática do espermatozoide sofre mudanças intra (Olson et al., 2004) e extracelulares, tais como proteólise e modificações de glicoconjugados na superfície celular (Jones, 1998). O fluido da cauda do epidídimo é rico em β -galactosidases, e uma série de glicosidases, auxilia na maturação espermática (Dacheux, 2005). Estas proteínas modificam glicoproteínas presentes na membrana espermática (Skudlarek et al., 1993) ou ligam-se a essa membrana, atuando como sítios de ligação a carboidratos. A remoção desses resíduos da zona pelúcida promove o bloqueio da ligação aos espermatozoides, sugerindo que essa enzima liga-se às células durante a maturação epididimária (Tulsiani et al., 1995).

A análise proteômica do plasma seminal de animais *Bos taurus* mostrou que a expressão de uma proteína denominada osteopontina (OPN) apresentou significativa associação com os índices de fertilidade avaliados por meio das taxas de não retorno ao cio de vacas inseminadas e em sistemas de fertilização *in vitro* (Killian et al., 1993; Moura et al., 2006a, b). A OPN, também conhecida como fosfoproteína secretada 1 (SPP1), é uma proteína ácida, com peso molecular entre 25 a 75 kDa, rica em ácidos aspártico e glutâmico (Sorenson e Petersen, 1994), e inicialmente isolada de tecido ósseo bovino (Franzen e Heinegard, 1985). A OPN possui funções como adesão celular, o que sugere sua participação na interação entre espermatozoide e oócito (Gonçalves et al., 2007), no remodelamento de membranas, nas alterações no citoesqueleto e na modulação imunológica (Denhardt, 2004). Estruturalmente, a OPN apresenta uma sequência RGD (arginina, glicina e aspartato) conservada com capacidade de ligação a integrinas (Butler, 1995; Gonçalves et al., 2007), sítio de ligação para a OPN nos espermatozoides (Gonçalves et al., 2007). Uma hipótese aceita para o mecanismo de ação da OPN na fertilização (Moura, 2005) apoia-se no conceito de que, durante a ejaculação, a OPN proveniente do fluido das glândulas sexuais acessórias liga-se à membrana espermática por meio das integrinas e esse complexo OPN-integrinas interage com receptores na membrana oocitária (D’Cruz, 1996). Tal hipótese pode ser corroborada pelo fato de que o fluido do oviduto bovino possui OPN (Gabler et al., 2003). Adicionalmente, a OPN também se liga ao receptor CD44 por meio de um domínio distinto da sequência RGD, e este receptor, geralmente, participa dos processos de adesão celular (Cichy e Puré, 2003) e é expresso tanto na membrana espermática (Bains et al., 2002) quanto na oocitária (Monaco et al., 2009).

Estudos recentes sugerem a participação da OPN no processo de fertilização e desenvolvimento embrionário (Monaco et al., 2009). A incubação de oócitos bovinos em fluido do oviduto, obtido durante a fase folicular, adicionado de anticorpos contra a isoforma de 36 kDa da OPN isolada do leite, reduz significativamente a capacidade dos espermatozoides de se ligarem à zona pelúcida (Gonçalves et al., 2007, 2008). É provável que, além de atuar no processo de interação de gametas durante a fertilização, a OPN desencadeie cascatas de sinalização intracelulares que favoreçam o desenvolvimento embrionário, explicando, em parte, sua associação com os índices de fertilidade dos reprodutores. A reestruturação da matriz extracelular é outro evento importante na interação espermatozoide-oócito, e as proteínas envolvidas nesses processos, bem como seus respectivos inibidores, apresentam funções importantes. Neste contexto, as “matrix metalloproteinases” e seus inibidores, as TIMPs (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*), têm sido descritas no plasma seminal de várias espécies (Hulboy et al., 1997; Shimokawa et al., 2002; Rego et al., 2010). A expressão de TIMP-2 no plasma seminal de bovinos apresenta também associação empírica com fertilidade de touros (McCauley et al., 2001), apesar de suas funções ainda não serem muito claras.

Conclusão

Há evidências de que as proteínas seminais modulam a função espermática. As relações empíricas entre algumas destas proteínas e índices de fertilidade em determinadas espécies indicam que elas são potenciais marcadores moleculares da capacidade reprodutiva dos animais. Experimentos comprovam também relações de causa e efeito entre fatores paternos, como a osteopontina, e eventos que ocorrem durante e após a fertilização. Atualmente, os setores ligados à produção animal apresentam demandas elevadas em termos de produtividade e, portanto, testes mais precisos necessitam ser desenvolvidos para avaliação dos reprodutores. Análises bioquímicas, associadas aos critérios de avaliação seminal existentes, podem auxiliar na identificação de diferenças importantes entre a fertilidade potencial dos animais. Tal estratégia deve, objetivamente, envolver o conhecimento adquirido sobre as proteínas seminais e os respectivos efeitos de tais componentes sobre as funções reprodutivas no macho.

Referências bibliográficas

- Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D.** Relationship between ironcatalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil*, v.98, p.257-265, 1993.
- Alvarez JG, Storey BT.** Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. *Biol Reprod*, v.28, p.1129-1136, 1983.
- Amann RP, Hammerstedt RH.** In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, v.14, p.397-406, 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.
- Bailey R, Griswold MD.** Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. *Mol Cell Endocrinol*, v.151, p.17-23, 1999.
- Bains R, Adeghe J, Carson J.** Human sperm cells express CD44. *Fertil Steril*, v.78, p.307-312, 2002.
- 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.
- Butler WT.** Structural and functional domains of osteopontin. *Ann New York Acad Sci*, v.760, p.6-11, 1995.
- Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M, Töpfer-Petersen E.** The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett*, v.399, p.147-152, 1996.
- Casao A, Cebrián I, Asumpción ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muño-Blanco T.** Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol*, v.11, p.59, 2010. Abstract.
- Cichy J, Puré E.** The liberation of CD44. *J Cell Biol*, v.161, p.839-843, 2003
- D'Cruz OJ.** Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. *Front Biosci*, v.1, p.161-176, 1996.
- Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F.** Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol*, v.250, p.36-42, 2006.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F.** Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v.63, p.319-341, 2005.
- de Lamirande E, Gagnon C.** Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility on intact spermatozoa and sperm axonemes. *J Androl*, v.13, p.368-378, 1992.
- Denhardt DT.** The third international conference on osteopontin and related proteins, 3, 2002, San Antonio, TX. *Calcif Tissue Int*, v.74, p.213-219, 2004.
- Elzanaty S, Erenpreiss J, Becker C.** Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. *Andrologia*, v.39, p.60-65, 2007.
- Fink E, Schill WB, Miska W.** Kinin-containing kininogen is present in human seminal plasma. *Adv Exp Med Biol*, v.247, p.311-315, 1989.
- Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL.** Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod*, v.62, p.1790-1803, 2000.
- Franzen A, Heinegard D.** Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*, v.232, p.715-724, 1985.
- Gabler C, Chapman DA, Killian GJ.** Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the estrous cycle. *Reprod*, v.126, p.721-729, 2003.
- Gatti J, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux J.** Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci*, v.82, p.321-339, 2004.
- Gonçalves RF, Staros AL, Killian GJ.** Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo 582 development. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.720-729, 2008.

- Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ.** Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (α and α 5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, v.67, p.468-474, 2007.
- Gwathmey TM, Igotz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS.** Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod*, v.75, p.501-507, 2006.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, v.280, p.1-8, 1990.
- Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC.** The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.731-745, 1995.
- Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Lan ZJ, Labus JC.** The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. *Curr Top Dev Biol*, v.33, p.61-102, 1996.
- Hohlbrugger G, Pschorr J, Dahlheim H.** Angiotensin I-converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. *Fertil Steril*, v.41, p.324-325, 1984.
- Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM.** Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod*, v.3, p.27-45, 1997.
- Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR.** Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem*, v.274, p.6875-6881, 1999.
- Ibrahim NM, Troedsson MH, Foster DN, Loseth KJ, Farris JA, Blaschuk O, Crabo BG.** Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytotoxicity. *J Androl*, v.20, p.230-240, 1999.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R.** Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res*, v.24, p.185-196, 1989.
- Jin YZ, Bannai S, Dacheux F, Dacheux JL, Okamura N.** Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. *Mol Reprod Dev*, v.47, p.490-496, 1997.
- 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.
- Jones R.** Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*, n.53, p.73-84, 1998.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA.** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v.49, p.1202-1207, 1993.
- Kraus M, Tichá M, Zelezná B.** Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *J Reprod Immunol*, v.65, p.33-46, 2005.
- Lima IC, Rocha DR, Salles MG, Martins JA, Souza M, Souza CE, Oliveira JTA, Araujo AA, Moura AA.** Reproductive criteria and seminal plasma proteins in rams and goats raised under conditions of heat stress in the Brazilian Northeast. In: North American Testis Workshop, 21, 2011, Montreal, QC, Canada. Schaumburg IL: American Society of Andrology, 2011.
- Macleod J.** The role of oxygen in the metabolism and motility of the human spermatozoa. *Am J Physiol*, v.138, p.512-518, 1943.
- Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW.** New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod*, v.80, p.394-397, 2009.
- 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.
- Meri S, Jarva, H.** Complement regulatory proteins. In: Nature encyclopedia of life sciences. London: Nature Ed, 2001. p.1-7.
- Métayer S, Dacheux F, Guérin Y, Dacheux JL, Gatti JL.** Physiological and enzymatic properties of the ram epididymal soluble form of germinal angiotensin I-converting enzyme. *Biol Reprod*, v.65, p.1332-1339, 2001.
- Monaco E, Gasparrini B, Boccia L, De Rosa A, Attanasio L, Zicarelli L, Killian G.** Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*, v.71, p.450-457, 2009.
- Moura AA.** Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. *Anim Reprod*, v.2, p.3-10, 2005.
- Moura AA, Chapman DA, 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, 2006a.
- Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ.** A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.169-188, 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, 2006b.
- Moura AA, Souza CE, Stanley BA, Chapman DA, Killian GJ.** Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J Proteomics*, v.73, p.2006-20, 2010.

- Nozaki A, Ikeda M, Naganuma A, Nakamura T, Inudoh M, Tanaka K, Kato N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J Biol Chem*, v.278, p.10162-10173, 2003.
- Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, v.5, p.399-420, 1999.
- Ohta A, Mohri T, Ohyashiki T. Effect of lipid peroxidation on membrane-bound Ca²⁺-ATPase activity of the intestinal brush-border membrane. *Biochim Biophys Acta*, v.984, p.151-157, 1989.
- Olson GE, Winfrey VP, Bi M, Hardy DM, NagDas SK. Zonadhesin assembly into the hamster sperm acrosomal matrix occurs by distinct targeting strategies during spermiogenesis and maturation in the epididymis. *Biol Reprod*, v.71, p.1128-1134, 2004.
- Perry AC, Jones R, Niang LS, Jackson RM, Hall L. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochem J*, v.285, p.863-870, 1992.
- Pietrobon EO, Soria M, Domínguez LA, Monclus Mde L, Fornés MW. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.58-63, 2005.
- Rego JPA, Sousa F, Souza CEA, Souza AL, Gozzo FC, Oliveira JTA, Araujo AA, Menezes ESB, Oliveira RV, Moura AA. Reproductive criteria of tropically-adapted Morada Nova Rams from Brazil. In: Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 43, 2010, Portland, OR. Madison, WI: SSR, 2010.
- Roldan ER, Shi QX. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci*, v.2, p.89-104, 2007.
- Schill WB. Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. In: Fritz H, Schimidt I, Dietze G (Ed.). *The kallikrein-kinin system in health and disease*. Hamburg: LimbachVerlag, 1989. p.171-203
- Shimokawa KK, Katayama M, Matsuda Y, Takahashi H, Hara I, Sato H, Kaneko S. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Mol Hum Reprod*, v.8, p.32-36, 2002.
- Skudlarek MD, Tulsiani DR, Nagdas SK, Orgebin-Crist MC. Beta-D-galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. *Biol Reprod*, v.49, p.204-213, 1993.
- Somlev B, Helili K, Karcheva V. Tissue kallikrein activity in seminal plasma of bovine ejaculates with different quality. *Theriogenology*, v.45, p.471-475, 1996.
- Sorenson ES, Petersen TE. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. *BBRB*, v.198, p.200-205, 1994.
- Soubeyrand S, Khadir A, Brindle Y, Manjunath P. Purification of a novel phospholipase A2 from bovine seminal plasma. *J Biol Chem*, v.272, p.222-227, 1997.
- Souza CEA, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci*, v.105, p.72-89, 2008.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*, v.35, p.1-10, 2005.
- Tenniswood MP, Guenette RS, Lakins J, Mooibroek M, Wong P, Welsh JE. Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Metastasis Rev*, v.11, p.197-220, 1992.
- Thaler CJ, Vanderpuye OA, Mcintyre JA, Faulk WP. Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. *Biol Reprod*, v.43, p.712-717, 1990.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid binding Proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, v.61, p.590-598, 1999.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induces cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, v.58, p.768-776, 1998.
- Töpfer-Petersen E, Petrounina AM, Ekhlesi-Hundrieser M. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.653-662, 2000.
- Tulsiani DR, Skudlarek MD, Araki Y, Orgebin-Crist MC. Purification and characterization of two forms of beta-D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein(s). *Biochem J*, v.305, p.41-50, 1995.
- Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.39-50, 2003.
- Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews, S, Puddefoot, JR, Saridogan E, Holt WV, Djahanbakhch O. Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul Pept*, v.67, p.131-135, 1996.