UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

BRUNA ALVES FELIX

PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS *RAM SEMINAL VESICLE PROTEINS* (RSVP14 E RSVP22) NO PLASMA SEMINAL OVINO

FORTALEZA

2017

BRUNA ALVES FELIX

PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS *RAM SEMINAL VESICLE PROTEINS* (RSVP14 E RSVP22) NO PLASMA SEMINAL OVINO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia. Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge André Matias Martins.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F36p Felix, Bruna Alves.
Purificação parcial das ram seminal vesicle proteins (rsvp14 e rsvp22) no plasma seminal ovino / Bruna Alves Felix. – 2017.
57 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura .
Coorientação: Prof. Dr. Jorge André Matias Martins.

1. Ram Seminal Vesicle Proteins. 2. Gelatina. 3. Heparina. I. Título.

CDD 636.08

BRUNA ALVES FELIX

PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS *RAM SEMINAL VESICLE PROTEINS* (RSVP14 E RSVP22) NO PLASMA SEMINAL OVINO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia. Área de Concentração: Reprodução Animal.

Aprovada em ____/_____/____.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

_____

Prof. Dr. Jorge André Matias Martins (Coorientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

_____

Prof. Dr. João Paulo Arcelino do Rêgo
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

_____

Dr. Maria Júlia Barbosa Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha amada família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, dono de toda ciência, sabedoria e poder, a quem agradeço pelas bênçãos sem fim e pela alegria de viver em sua presença.

À Universidade Federal do Ceará, pelo apoio durante o período de mestrado e da graduação em Zootecnia, principalmente por sua estrutura e funcionários que nos apoiam sempre que possível.

Ao Curso de Pós Graduação em Zootecnia e a sua coordenação por conceder a oportunidade e a organização de tudo, em especial a Francisca e ao atual coordenador Prof. Ednardo Rodrigues Freitas.

À Fundação Cearense de apoio ao desenvolvimento cientifico e tecnológico (FUNCAP), por conceder o financiamento do projeto e a manutenção da bolsa.

Aos meus queridos e amados pais, Maria e Antônio Félix por sempre apoiarem meus sonhos.

Ao meu amor, Luís Adair, por suportar meus defeitos, tolerar meus humores e principalmente por me entender. Amo você.

A minha irmã, presente maravilhoso de Deus, pela confiança, carinho, amor e amizade de sempre.

A todos os outros membros de minha família, em especial, cito, meus avôs paternos, Rozilda e Francisco Félix e avôs maternos, Tereza e Miguel Alves, pelo amor incondicional que sempre encontrei em seus conselhos.

Ao meu orientador, Dr. Arlindo Moura, por compartilhar seus conhecimentos, por toda sua dedicação, atenção e boa vontade durante a execução deste trabalho.

Ao meu coorienador, Jorge Martins, pelos brilhantes ensinamentos profissionais, conselhos e sugestões valiosas durante a condução deste trabalho.

Aos queridos membros da banca, Jorge Martins, João Paulo Rêgo e Maria Julia Bezerra, pela honra de compartilharem comigo os seus conhecimentos enriquecendo, grandemente, este estudo.

Aos professores do curso de Zootecnia, que sempre me apoiaram no que precisava, dedicando seu tempo.

A irmã que ganhei durante minha caminha acadêmica, Kamlia Sousa, por toda sua amizade, companheirismo e dedicação. Com certeza, minha amiga, a sua amizade é um ingrediente essencial em minha vida.

Ao Fagner Cavalcante, amigo querido que não mediu esforços para ajudar na execução do trabalho.

A família que ganhei dentro do laboratório de fisiologia animal, dos quais cito; Kamila Sousa, Solange Damasceno, Monica Marcela Ramirez, Deisy Johana Diaz, Revila Melo, Maria Julia Bezerra, Mayra Vettorazzi, Taciane Alves, Caroline Wolf, Moemia Portela, Ana Luiza Cazaux, Fagner Cavalcante, Lucas Fonseca, Eduardo Pessoa, Jander Fabricio, Fabio Vasconcelos, Aderson Viana, Renato Passos, Thiago Victor, Jorge Martins, Walfran Lopes, Antônio Carlos e David Vale.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(*Madre Teresa de Calcutá*)

RESUMO

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de desenvolver uma metodologia para purificar as RSVPs (*Ram Seminal Vesicle Protein*) de 14 kDa e 22 kDa. O trabalho foi desenvolvido com 16 animais da raça Morada Nova, mantidos em sistema intensivo de produção, dos quais amostras de sêmen foram coletadas semanalmente por meio de eletroejaculador, para separação do plasma seminal das células espermáticas por meio de centrifugações. As proteínas do plasma seminal foram precipitadas com etanol frio e 6,15 mg/mL de proteínas totais foram submetidas à cromatografia líquida de afinidade por gelatina, utilizando uma resina Gelatina-Sepharose acoplada a um sistema cromatográfico automatizado. As proteínas foram eluídas em quatro picos cromatográficos (P1, P2, P3 e P4), dos quais P1 e P2 continham proteínas com baixa ou nenhuma afinidade pela gelatina e P3 e P4 abrangeu as proteínas com domínios de fibronectina II com alta afinidade à gelatina. Uma alíquota de 20 µg de proteínas, de cada pico, foi submetida à técnica de SDS-PAGE a 12,5% e outra alíquota contendo 20 µg de proteínas, foi submetida à técnica de Western Blot, utilizando anticorpos primários anti-BSPs ovinas. Os pesos moleculares das proteínas separadas por eletroforese foram determinados com o auxílio do aplicativo Quantity One, no qual foram detectadas 5 bandas proteicas em P4, com pesos moleculares entre 12 e 30 kDa. A técnica de Western Blot demonstrou marcação específica para RSVP nos quatro picos, enquanto que P1 e P2 a marcação foi menos intensa, devido alguma forma agregada ou associada a fosfolipídios das proteínas RSVPs que acarretou em uma leve marcação na imunodetecção e em P3 e P4 a marcação foi especifica. O pico P4 foi submetido a um segundo passo cromatográfico, na coluna HiTrap™ Heparin HP. Neste caso, o P4 originou dois picos cromatográficos (P1 e P2) bem definidos, em que P1 abrangeu as proteínas com baixa ou nenhuma afinidade a heparina e P2, as proteínas com afinidade a heparina. As proteínas dos dois novos picos foram submetidas às técnicas de SDS-PAGE a 12,5%, e Western Blot, no qual foi possível detectar a presença de 3 bandas proteicas em P1 e 3 bandas proteicas em P2. Acredita-se que a RSVP14 e RSVP22 estejam contidas na fração sem afinidade à heparina e na fração com afinidade à gelatina, respectivamente, necessitando de mais testes para comprovar nossas teorias iniciais.

Palavras Chaves: *Ram Seminal Vesicle Proteins*. Gelatina. Heparina. Plasma seminal ovino.

ABSTRACT

The present study aimed to develop a methodology to purify the RSVPs (*Ram Seminal Vesicle Protein*) of 14 kDa and 22 kDa. The work was developed with 16 animals of the Morada Nova breed, kept in an intensive production system, which the samples of semen were collected weekly by means of electro-ejaculator, to separate seminal plasma from the sperm cells through centrifugation. Seminal plasma proteins were precipitated with cold ethanol and 6.15 mg/mL of total proteins were subjected to liquid gelatin affinity chromatography using a Gelatin-Sepharose matrix coupled to an automated chromatographic system. Proteins were eluted into four peaks (P1, P2, P3 and P4), which P1 and P2 contained proteins with low or none affinity for gelatin and P3 and P4 encompassed proteins with fibronectin II domains with high affinity to gelatin. An aliquot of 20 µg of proteins from each peak was subjected to the 12.5% SDS-PAGE technique and another aliquot containing 20 µg of proteins was subjected to Western Blot technique using primary ovine anti-BSPs. The molecular weights of proteins separated by electrophoresis were determined with the aid of the Quantity One Software, which 5 protein bands were detected in P4, with molecular weights between 12 and 30 kDa. The Western blot technique demonstrated specific labeling for RSVP at all four peaks, whereas P1 and P2 labeling was less intense, due to some aggregate or phospholipid-associated form of RSVP that resulted in a slight immunodetection labeling, and at P3 and P4 labeling was specific. The last peak, P4, was subjected to a second chromatographic step on the HiTrap ™ Heparin HP column. Therefore, P4 originated two well-separated chromatographic peaks (P1 and P2), where P1 encompassed the proteins with low or none affinity to heparin and P2, the proteins with affinity to heparin. Proteins from the two new peaks were submitted to 12.5% SDS-PAGE and Western Blot, which it was possible to detect the presence of 3 protein bands in P1 and 3 protein bands in P2. It is believed that RSVP14 and RSVP22 are present in the fraction with no affinity to heparin and fraction with affinity to gelatin, respectively, requiring further testing to prove our initial theories.

Key-words: *Ram Seminal Vesicle Proteins*. Gelatin. Heparin. Ram seminal plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cromatográfica de afinidade à gelatina com proteínas do plasma seminal de ovinos..... 33

Figura 2 – SDS-PAGE 1-D com proteinas ligadas e não ligadas à gelatina..... 34

Figura 3 – Membrana PVDF imunizada contra anticorpo Anti-Binder of SPerm ovino com proteínas ligadas e não ligadas à gelatina..... 35

Figura 4 – Cromatográfica de afinidade à heparina com proteínas contidas na fração P4 ligadas à gelatina..... 35

Figura 5 – SDS-PAGE 1-D com proteínas ligadas e não ligadas à heparina..... 36

Figura 6 – Membrana PVDF imunizada contra anticorpos Anti-Binder of SPerm ovino com proteínas ligadas e não ligadas à heparina..... 36

Figura 7 – Membrana PVDF imunizada contra anticorpos Anti- rBdh-1 com proteínas ligadas e não ligadas à heparina..... 37

Figura 8 – Estratégia cromatográfica aplicada para purificação de BSPs ovinas a partir do plasma seminal de Morada Nova..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	unidimensional
µg	micrograma
µl	microlitro
aSFP	proteína ácida do fluido seminal bovino
BSP	Binder of Sperm Proteins
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
g	grama
h	hora(s)
HDL	lipoproteína de alta densidade
kDa	kiloDalton
M	molar
mA	miliamperagem
mAu	miliunidade de absorbância
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NaCl	Cloreto de sódio
P1	pico 1 (proteínas do primeiro pico)
P2	pico 2 (proteínas do segundo pico)
P3	pico 3 (proteínas do terceiro pico)
P4	pico 4 (proteínas do quarto pico)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	potencial hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RSVP	Ram Seminal Vesicle Protein
rBdh-1	bodesina
SDS	dodecil-sulfato de sódio
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volts

W	Watt

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO.**	15
2	**REVISÃO DE LITERATURA.**	17
2.1	**Proteínas do plasma seminal.**	17
2.1.1	***Propriedades biológicas das proteinas ligadoras de fosfolipídeos.***	19
2.2	**Proteínas que participam da capacitação espermática.**	21
2.3	**Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação entre gametas.**	23
2.4	**Proteínas ligadas à heparina.**	23
2.5	**Método de purificação proteica: cromatografia.**	26
2.6	**Cromatografia de afinidade.**	27
3	**MATERIAL E MÉTODOS.**	28
3.1	**Coleta e processamento do plasma seminal ovino.**	28
3.2	**Precipitação com etanol do plasma seminal ovino.**	28
3.3	**Quantificação da concentração de proteína total do plasma seminal.**	28
3.4	**Cromatografia de afinidade a Gelatina.**	29
3.5	**Cromatografia de afinidade a Heparina com proteínas GBPs.**	29
3.6	**Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e análise computacional em gel.**	30
3.7	**Imunodetecção de BSPs ovinas em frações de proteínas de plasma seminal com ou sem afinidade para gelatina e heparina.**	31
4	**RESULTADOS.**	33
5	**DISCUSSÃO.**	39
6	**CONCLUSÃO.**	43
	REFERÊNCIAS.	44
	ANEXO A - PROTOCOLO DO GEL DE ELETROFORESE 1D.	54
	ANEXO B - SOLUÇÃO CORANTE PARA GEL 1D.	56
	ANEXO C - SOLUÇÃO DESCORANTE PARA GEL 1D.	57

1 INTRODUÇÃO

O plasma seminal é secreção fisiológica mista, oriunda de varias glândulas do trato reprodutivo masculino (LEDESMA *et al*., 2016), tais como os testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (ampolas, glândulas vesiculares e bulbouretrais), auxiliando como meio de transporte para os espermatozoides durante a ejaculação e sobrevivência no sistema reprodutivo feminino (EVANS *et al*., 1987). O plasma seminal é composto de íons inorgânicos, açúcares, sais orgânicos, lipídios, enzimas, prostaglandinas e proteínas (SOLEILHAVOUP *et al*., 2014).

As principais proteínas do plasma seminal de algumas espécies de mamíferos são membros de duas famílias de proteínas, as espermadesinas, consideradas as principais proteínas do plasma seminal de javalis, e as BSPs (Binder of Sperm Proteins), apontadas como as principais proteínas do plasma seminal de bovinos (BERGERON et al., 2005), secretadas pelas glândulas vesiculares e ampolas, que se ligam `a membrana dos espermatozoides e atuam na capacitação espermática (MANJUNATH et al., 1987, 2009; DESNOYERS et al., 1994; VILLEMURE et al., 2003; BERGERON et al., 2005; LUSIGNAN et al., 2007).

As proteínas BSPs induzem o efluxo de colesterol na membrana espermática, ligando-se aos fosfolipídios (THÉRIEN et al., 2013) para promover a capacitação espermática (MANJUNATH et al., 2002, PLANTE et al., 2012). Além disso, no trato reprodutivo feminino, as BSPs ligadas aos espermatozoides continuam a promover o efluxo de lipídeos de membrana na presença de lipoproteínas de alta densidade ou glicosaminoglicanos (GAGs), aumentando as taxas de capacitação e, ainda, a reação acrossômica (THÉRIEN et al. , 1997, PARRISH et al., 2014). Esta propriedade de ligação aos espermatozoides confere às proteínas BSPs seu papel biológico na estabilização da membrana espermática (decapacitação) e desestabilização (capacitação) durante o processo de fertilização (BERGERON et al., 2005). No estudo de Bergeron et al., 2005, foi identificado algumas proteínas, no plasma seminal de ovinos, como membros da família das BSPs, as quais foram denominadas de RSVPs (Ram Seminal Vesicle Proteins). As RSVPs são secretadas especificamente pelas vesículas seminais ovinas (FERNANDEZ-JUAN et al., 2006) e ligam-se à membrana plasmática de espermatozoides, exercendo efeito de proteção (BARRIOS et al., 2005). Segundo Rêgo (2010), as RSVPs de 14 kDa e 22 kDa estão entre as proteínas mais abundantes no plasma seminal de ovinos representando, respectivamente, 6,6 e 5,0% da intensidade total dos *spot*s detectados em géis 2-D. Portanto, as proteínas BSPs exercem ação sobre a fisiologia dos

espermatozoides, modulando a funcionalidade dos mesmos (RODRIGUEZ et al., 2011;CABALLERO et al., 2012) e nas biotecnologias reprodutivas, em especial, como marcadoras de fertilidade de reprodutores, congelabilidade seminal, criopreservação do sêmen e nos resultados de inseminação artificial, (CAVALCATE, et al., 2013). O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de desenvolver uma metodologia para purificar as RSVPs de 14 e 22 kDa, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal de mamíferos contém uma variedade de componentes bioquímicos, alguns dos quais são relativamente específicos para a regulamentação da função espermática (STRZEZEK *et al*., 1992). Portanto, o plasma seminal é um fluido complexo, rico em proteínas, minerais, alguns carboidratos e íons, provenientes dos testículos, da *rete testis*, do epidídimo e principalmente das glândulas sexuais acessórias (MUIÑO BLANCO *et al*., 2008).

A composição proteica do fluido seminal de algumas espécies domésticas foi determinada por meio da análise proteômica, pois a mesma fornece informações sobre os mecanismos que determinam a capacidade de fertilização dos espermatozoides, bem como sobre os eventos que ocorrem durante a maturação epididimária e espermatogênese (URNER *et al*., 2003). Dentro desse contexto, um estudo realizado por Van Tilburg *et al.*, 2017, em que as proteínas associadas à capacitação de espermatozoides, tais como a proteína F-actina *capping*, a endoplasmina e Rho GDP-inibidor de dissociação, identificadas nos fluidos da *rete teste* de carneiros, sugere que os espermatozoides herdam tais componentes antes de deixarem os testículos e estas moléculas são associadas com as funções da capacitação espermática. As proteínas da *rete teste* fazem parte de células do espermatozoide e contribuirão para o processo de capacitação espermática (ICKOWICZ *et al*., 2012).

O fluido seminal desempenha importante função para sobrevivência dos espermatozoides desde a ejaculação. Algumas proteínas são absorvidas pela membrana espermática e nela permanecem até a deposição de seu material genético no óvulo, elevando os índices de fertilidade (MANJUNATH *et al*., 2009).

Por ser rico em proteínas que alteram as membranas e o metabolismo espermático (FAVERETO *et al*., 2008), essas substâncias protegem as células espermáticas contra efeitos oxidativo e imunológico do trato genital feminino, aumentando, consequentemente, o potencial fertilizante dos gametas (PESCH *et al*., 2006), reação proveniente, principalmente, da redução de peróxidos por proteínas ácidas presentes no fluido seminal (aSFP; 13kDa), e pela enzima desidrogenasse láctica C4 (SILVA *et al*., 2003).

As relações entre os índices de fertilidade e as proteínas seminais em determinadas espécies indicam que estas proteínas são potenciais marcadores da capacidade reprodutiva do macho (JOBIM *et al*., 2003). Dentre os grupos proteicos estudados se destacam os

relacionados à capacitação espermática e a reação acrossômica (MOURA *et al*., 2011), uma vez que estas proteínas modulam os espermatozoides preparando-os para o processo de fertilização e transmissão do material genético masculino.

No estudo de Barrios *et al*., 2000, foram encontradas duas bandas proteicas de 14 e 20 kDa relacionadas a proteção espermática, que resultou na restauração da integridade da membrana plasmática de 50% dos espermatozoides avaliados em microscopia eletrônica de varredura. Verificou-se no estudo de Barrios *et al*., 2005, que as proteínas de 14 e 20 kDa no plasma seminal de ovinos eram adsorvidas pela superfície dos espermatozoides, estabilizando-a, tendo por consequência a prevenção da injúria da célula espermática após tratamento contra choque térmico. Este efeito protetor está relacionado à ação decapacitante promovida pela estabilização da membrana espermática, uma vez que a proteína de 20 kDa é liberada da membrana do espermatozoide ovino logo após o início da capacitação espermática, enquanto a proteína de 14 kDa era liberada não só durante capacitação, mas principalmente após a indução da reação acrossômica.

Objetivando localizar a origem da expressão das proteínas de 14 e 20 kDa no aparelho reprodutor de carneiros, Fernandez-Juan *et al*., 2006, mostraram que estas proteínas tinham seu local de síntese restrito à glândula vesicular, expressas no citoplasma das células de seu epitélio secretor, passando a referenciar estas proteínas como RSVP (Ram Seminal Vesicle Protein) de 14 e 20 kDa (RSVP14 e RSVP20, respectivamente).

Apesar da RSVP14 e RSVP20 serem semelhantes quanto à proteção do espermatozoide, o estudo comparativo de sua sequência de aminoácidos mostrou que de fato tratam-se de proteínas diferentes (BARRIOS *et al*., 2005). A sequência de aminoácidos da RSVP14 apresenta grande homologia com a proteína do plasma seminal bovino BSP1 (MANJUNATH *et al*., 1987), demostrando que a RSVP14 contém uma parte do domínio fibronectina II (FN II) da BSP1.

O estudo proteômico do plasma seminal de carneiros adultos da raça Santa Inês mostrou a expressão das RSVPs de 14 e 22 kDa (RÊGO, 2010). Estas proteínas apresentam uma estrutura secundária comum composta por N-terminal variável seguido por domínios FN II de aproximadamente 40 aminoácidos, separados por uma sequência de sete aminoácidos e por um C-terminal também variável (MANJUNATH *et al*., 2009).

A RSVP14 ocupa a maior parte da estrutura proteica que rodeia o espermatozoide ovino, cujo efeito protetor é devido à associação da RSVP14 com a membrana espermática, formando uma barreira protetora ao estabilizar os fosfolipídios de membrana, explicando assim o efeito protetor desta proteína contra as injúrias do choque térmico e como fator

decapacitante (BARRIOS *et al*., 2005). A RSVP14 também está envolvida na capacitação espermática e na interação de gametas (BARRIOS *et al*., 2005; CARDOZO *et al*., 2006). Esta proteína tem o ponto isoelétrico (*pI*), massa molecular e sequência de aminoácidos quase idêntica a uma proteína de 15 kDa, (BERGERON *et al*., 2005) encontrado no plasma seminal de carneiros da raça Suffolk. Diferenças no *pI* de dois *spot*s, encontrados por Rêgo (2010), podem ser causados por diferentes níveis de fosforilação, pois Barrios *et al*., 2005, acreditam que a RSVP14 é fosforilada. Um estudo realizado com o plasma seminal de carneiros Santa Inês mostrou que um grupo de *spot*s de, aproximadamente, de 14 kDa e *pI* variando entre 5 a 6 já era expressos às 15 semanas de idade, 13 semanas antes dos animais atingirem a puberdade, e quando o número de espermatozoides móveis ainda era mínimo no ejaculado (SOUZA *et al*., 2010). Assim, acredita-se que a RSVP14 faça parte dos primeiros componentes secretados no plasma seminal de carneiros Santa Inês pré-púberes, (RÊGO, 2010).

A RSVP22 foi identificada em cinco *spot*s no mapa 2-D do plasma seminal dos carneiros, em que os *spot*s correspondentes à RSVP 22 apresentaram distribuição heterogênea no mapa proteico do plasma seminal, com massa molecular de 16,6 e 61,3 kDa e *pI*s de 4,2 a 6,1 (RÊGO, 2010). Essa distribuição heterogênea pode estar relacionada com modificações pós - traducionais, incluindo fosforilação (BARRIOS *et al*., 2005) ou glicosilação (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

2.1.1 Propriedades biológicas das proteínas ligadoras de fosfolipídios

As propriedades biológicas da família das BSPs (*Binder of Sperm Proteins*) foram extensivamente estudadas (FAN *et al*., 2006). As BSPs compartilham uma massa molecular relativamente baixa (12-30 kDa), podendo serem glicosiladas ou não (MANJUNATH *et al*., 2007). Seu papel na fertilização, especificamente na capacitação de espermatozoides, é devido aos dois domínios do tipo II, semelhantes aos da fibronectina (ESCH *et al*.,1983; CALVETE *et al*., 1996), o que conferem a capacidade de ligação ao grupo de fosfolípides de colina presentes na membrana dos espermatozoides (DESNOYERS *et al*, 1992), ao HDL e glicosaminoglicanos de heparina (GAGs) (MANJUNATH *et al*., 1987; DESNOYERS *et al*., 1992).

Quatro tipos de BSPs na espécie bovina são relatados na literatura: BSP-A1/A2, BSP3 e a BSP5 (MANJUNATH *et al*., 2009). As BSP-A1 e BSP-A2 são normalmente

encontradas agregadas mesmo em processos de separação e purificação proteica, sendo, muitas vezes consideradas como um complexo, BSP-A1/A2. Seus pesos moleculares aproximados são de 16,5 e 16,0 kDa, respectivamente, e possuem composição idêntica em aminoácidos (SOUZA *et al*., 2011), por isso são consideradas como uma única proteína, BSP1. A BSP3 possui composição de aminoácidos diferente da BSP1, principalmente por não se tratar de uma glicoproteína, o que reflete no seu menor peso molecular, 15 kDa (MANJUNATH *et al.,* 2009). A BSP5 é considerada a proteína mais glicosilada da família BSP, o que explica o seu maior peso molecular (28 - 30 kDa) em relação as outras proteínas BSPs (CALVETE *et al.,* 1996; MARTINS, 2010).

Na ejaculação, os espermatozoides são misturados com líquido seminal e com as proteínas BSPs por um breve período (10-15 min). Durante esta curta exposição, as proteínas BSPs removem de 5-8% do colesterol (1º efluxo de colesterol) da membrana do espermatozoide. Ao mesmo tempo, as proteínas BSPs se ligam a colina de fosfolipídios na membrana plasmática dos espermatozoides, evitando a livre circulação de fosfolipídios e estabilizando a membrana espermática (MANJUNATH *et al*., 1987). À medida que o espermatozoide alcança o oviduto, as proteínas BSPs ligadas à membrana interagem com o HDL que está presente no oviduto e / ou nos fluidos foliculares, resultando em mais remoção de colesterol (2º efluxo de colesterol) bem como remoção de proteínas BSP da membrana espermática (MANJUNATH *et al*., 1987). Isto desestabiliza a membrana e induz algumas vias de transdução de sinal intracelular, entre as quais o aumento da permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} e ao seu pH intracelular. GAGs como a heparina no trato genital feminino (particularmente no oviduto, fluido folicular e na matriz extracelular das células de cumulus) também poderiam desempenhar um papel neste mecanismo de capacitação, uma vez que também interagem com BSPs (HANDROW *et al*., 1982; MEIZEL *et al*., 1986, FIRST *et al*., 1987).

Inversamente a este papel positivo na fertilidade, as proteínas BSPs podem também ter efeitos negativos no contexto do armazenamento dos espermatozoides. Foi demonstrado que o efluxo de colesterol induzido pelas proteínas BSPs dependente do tempo de exposição dos espermatozoides (MANJUNATH *et al.,* 1984). Logo a exposição durante longo período de tempo poderia ser prejudicial para a membrana dos espermatozoides. Resultados indicaram que as proteínas BSPs formaram complexos estáveis com lipoproteínas de baixa densidade da gema de galinha, usadas em diluidores ou extensores (meios de preservação do espermatozoide). Consequentemente, o efeito deletério das proteínas BSPs nos

espermatozoides é minimizado ou completamente inibido e, portanto, os espermatozoides podem ser armazenados em estado líquido ou congelados (MANJUNATH *et al*., 1984).

2.2 Proteínas que participam da capacitação espermática

Após a maturação epididimária que envolve alterações bioquímicas, os espermatozoides são capazes de movimentação ativa, porém não possuem capacidade imediata de fertilização (FLESCH *et al*., 2000). Logo, a capacitação é um processo complexo que ocorre após o espermatozoide estar presente no trato genital feminino (MARTINEZ *et al*., 1996) e tal processo envolve alterações estruturais da membrana que incluem a perda de componentes adsorvidos, alterações em sua composição lipídica e maior permeabilidade a íons (DE LAMIRANDE *et al*., 1997; CROSS, 1998; VISCONTI *et al*., 1998), para que possam ocorrer às interações necessárias com os oócitos e a fertilização (PAPA *et al*., 2008).

Estudos recentes têm demonstrado cada vez mais que as proteínas seminais têm papel fundamental nesse evento fisiológico, algumas delas já foram identificadas em estudos com espécies animais e em humanos, outras ainda permanecem desconhecidas ou sem função esclarecida. Um grupo de importância, já com estudos avançados é o das BSPs que representam aproximadamente 30% do total de proteínas encontradas no plasma seminal (MANJUNATH *et al*., 1987) e 86% das proteínas do fluido das glândulas sexuais acessórias de bovinos (MOURA *et al*., 2006), sendo esta espécie que apresenta o maior grupo de proteínas seminais conhecidas (JOBIM *et al*., 2005).

As BSPs se unem aos glicosaminoglicanos no trato genital da fêmea e formam complexos que protegem os espermatozoides contra os efeitos oxidativos que ocorrem no trato genital feminino (SOUZA *et al*., 2011) e que facilitam de forma direta a ligação com outras proteínas mais precisamente, aquelas ligadas à heparina, induzindo o processo de capacitação das células espermáticas (JOBIM *et al*., 2009).

Durante o trajeto dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, as BSPs ligadas à membrana espermática durante a ejaculação permanecem ligadas até alcançarem o oviduto, auxiliando na interação entre os espermatozoides e o epitélio do oviduto (GWATHMEY *et al*., 2003, 2006), bem como formam sítios de ligação para a heparina e a HDL na membrana espermática (THÉRIEN *et al*., 1995, 1997), os quais, de forma independente, completariam o processo de capacitação espermática. A ligação das BSPs à membrana espermática aumenta o número de sítios de ligação para a heparina e outros

galactosaminoglicanos (THÉRIEN *et al*., 2005) os quais passam a intereagir com os espermatozoides (MILLER *et al*., 1990).

Ao atingirem o oviduto os espermatozoides interagem com a HDL, impulsionando uma segunda remoção de colesterol, diminuindo ainda mais a relação colesterol:fosfolipídeos, o que desestabiliza a membrana espermática e inicia vias de transdução de sinais que regulam a expressão de receptores para glicoproteínas da zona pelúcida, em outras palavras, torna os espermatozoides aptos a sofrerem a reação acrossômica (BENOFF *et al*., 1993; THÉRIEN *et al*., 1998).

Um fator relevante é o fato de existir no plasma seminal proteínas inibidoras do processo de capacitação, ou fatores decapacitantes. Acreditava-se que esses fatores tinham papel prejudicial no processo de fertilização, entretanto, a prevenção da capacitação até o momento que o espermatozoide encontra o oócito é essencial para que ocorra a fecundação. Alguns mecanismos presentes durante o contato das proteínas seminais com o ambiente uterino são capazes de auxiliar na remoção de tais fatores (MANJUNATH *et al*., 2009). Essa remoção ou alteração na superfície espermática constitui uma importante parte para o processo de capacitação. Estes materiais removidos ou alterados durante a capacitação incluem os chamados fatores decapacitantes, como as caltrina, que previne o aumento da concentração dos íons de Ca^{+2} nos espermatozoides e impedem uma capacitação precoce como a provocada pelo processo de criopreservação (FLESCH *et al*., 2000).

Portanto, a capacitação espermática ocorre quando os espermatozoides atingem o trato reprodutivo da fêmea, ali os componentes da membrana dos espermatozoides são modificados e/ou removidos pelas secreções do trato genital da fêmea, desestabilizando a bicamada fosfolipídica, e permitindo a ativação do acrossoma. As modificações morfofuncionais e bioquímicas ocorridas podem incluir depleção do colesterol na superfície espermática, alteração nos glicosaminoglicanos, e mudanças nos íons à medida que os espermatozoides atravessam o trato genital feminino, aumentando a afinidade da célula espermática pela zona pelúcida (FLASCH *et al*., 2000). O processo de capacitação induz modificações no acrossoma, transformações estas necessárias para propiciar a penetração do espermatozoide nos revestimentos do óvulo. Deste modo, esse processo impede a ativação prematura do acrossoma até que a célula espermática atinja o local de fertilização e entre em contato com o óvulo (POIANI, 2006).

2.3 Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação entre gametas

Segundo Hafez (2004), a reação acrossômica envolve a fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrossoma, liberando enzimas hidrolíticas como a acrosina e a hialuronidase, que resultam na penetração do óvulo. As fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas de peso molecular entre 14 a 20 kDa, descobertas em fluidos corporais (DENNIS, 1994). A enzima PLA2 no trato reprodutivo masculino, regula a maturação espermática e a reação acrossômica (UPRETI *et al*., 1994), transformando os fosfolipídios em lisolipídios, como a lisolecitina. Os espermatozoides tratados com lisolecitina apresentam fusão das membranas plasmática e acrossômica durante a reação acrossômica (ROLDAN *et al*., 1993), um evento essencial para a fertilização. A participação na síntese de ácido araquidônico ocorre quando a PLA2 é ativada pela progesterona, Ca^{2+} e pela proteína kinase C. Então o ácido araquidônico é convertido em prostaglandina, a qual induz o influxo de Ca^{2+} através da membrana espermática ocasionando a fusão das membranas e consequentemente, a reação acrossômica (JOBIM *et al*., 2009). Estas enzimas foram detectadas no sêmen de carneiros (ROLDAN *et al*., 1993), bodes (ATREJA *et al*., 1992) e touros (SOUBEYRAND *et al*., 1997), próxima ao acrossoma (RIFFO *et al*., 1996). No carneiro, há baixos níveis desta proteína no plasma seminal, sugerindo que a PLA2 origina-se no epidídimo ou é liberada do espermatozoide (UPRETI *et al*.,1999).

2.4 Proteínas ligadas à heparina

A heparina é um polissacarídeo ácido pertencente ao grupo dos glicosaminoglicanos (GAGs), secretada por diversas células animais, incluindo as que constituem a mucosa do trato reprodutivo feminino (LEE *et al*., 1985), sendo um dos mais potentes indutores da capacitação espermática em bovinos (HANDROW *et al*., 1982; Miller *et al*., 1986). Esta molécula se liga aos espermatozoides por meio de proteínas (NASS *et al*., 1990), e esta interação é mediada por trechos de resíduos de aminoácidos básicos resultando numa carga altamente positiva na proteína que neutraliza os grupos ácidos de GAGs (CARDIN *et al*., 1989).

As proteínas de ligação à heparina são encontradas em tecidos (CHANDONNET *et al*., 1990) e fluidos corporais de mamíferos. Mais especificamente as proteínas de ligação à heparina são secretadas pela próstata, glândulas bulbo-uretrais e vesiculares no plasma seminal, sendo estas últimas a principal fonte (MILLER *et al*., 1990). Estas proteínas não estão presentes em espermatozoides epididimais (MCCAULEY *et al*., 1996) e sua expressão é dependente de andrógenos, uma vez que animais castrados reduzem significativamente a

secreção de proteínas ligadas à heparina, a qual é restaurada aos níveis iniciais após reposição de testosterona (NASS *et al*., 1990).

No estudo de Bellin *et al*., 1994, foi avaliado os índices de fertilidade *in vivo* em um número considerável de animais de raças de corte que identificou uma série de proteínas de ligação à heparina sugerindo que as mesmas possam servir como indicadores de fertilidade em touros, concordando com índices descritos posteriormente por Mccauley et al., 2001.

Utilizando ensaios de ligação a heparina radioativa, Marks et al.,1985, observaram que espermatozoides oriundos de touros de alta fertilidade possuíam maior afinidade pela heparina que aqueles originados de touros de baixa fertilidade, apesar dos dois grupos apresentarem o mesmo número de sítios de ligação para heparina. Portanto, a afinidade, e não a presença da heparina na membrana espermática está relacionada ao potencial de capacitação de reação acrossômica dos espermatozoides. Nesse contexto, cinco famílias de proteínas ligadoras de heparina com diferentes afinidades à heparina foram identificadas (MILLER *et al.*, 1990). Entre elas, o complexo HBP-B5 é o que apresenta a maior afinidade (BELLIN *et al.*, 1994), sendo formado por múltiplas proteínas, com massas moleculares de 31, 24 e 14 – 18 kDa (MILLER *et al.*, 1990). Em estudos conduzidos por Bellin et al.,1994, observou-se que dentre os grupos de proteínas com afinidade à heparina, a de 30-31 kDa tem maior importância por ser considerada como marcador bioquímico para a fertilidade.

Possivelmente, toda HBP-B5 anteriormente presente no plasma seminal ligou-se com maior afinidade aos espermatozoides induzindo a capacitação mais eficiente. De fato, quando machos de parâmetros andrológicos e seminais semelhantes são agrupados com base no conteúdo de proteínas ligadas à heparina na membrana espermática, podem-se detectar diferenças de até 40% nas taxas de prenhez (BELLIN *et al.*, 1996).

Touros com circunferência escrotal e características seminais equivalentes foram agrupados de acordo com a presença ou ausência da HBP-B5 na membrana espermática ou no plasma seminal. Os animais foram mantidos com as fêmeas por dois meses, e a taxa de prenhez foi determinada 60 dias após o fim da estação de cobertura. Touros que apresentavam o complexo HBP-B5 ligado à membrana espermática, contudo não detectável no plasma seminal, apresentaram uma fertilidade 17% maior que aqueles com outros perfis de HBP-B5 (BELLIN *et al.*, 1994).

O antígeno associado à fertilidade (FAA) é um dos componentes do complexo HBP-B5, com massa molecular de 31 kDa, secretado pelas glândulas vesiculares e próstata (BELLIN *et al.*, 1998; MCCAULEY *et al.*, 1999). Pesquisas mostraram que o FAA associado à membrana espermática pode funcionar como marcador para fertilidade masculina, mesmo

em machos com idêntica capacidade de serviço, medida pelo número de ejaculações aparentes, em touros expostos a novilhas em estro (BELLIN *et al.*, 1998).

Em um estudo comparando taxas de prenhez ao primeiro serviço, fêmeas inseminadas com sêmen contendo FAA ligada aos espermatozoides apresentaram taxa de prenhez 15,9% maior que aquelas inseminadas com espermatozoides sem FAA (SPROTT *et al.*, 2000). Independentemente da idade ou raça, touros FAA positivos foram 9% mais férteis que touros FAA negativos (BELLIN *et al.*, 1998). Portanto, a determinação dos perfis de FAA pode ser utilizada para identificar animais sub-férteis, não detectados durante o exame andrológico ou testes de capacidade de serviço.

A concentração de outro componente do complexo HBP-B5, com massa molecular de 24 kDa (HBP-24), também está relacionado à fertilidade. Dados obtidos da mobilidade proteica em SDS-PAGE e homologia da sequência de aminoácidos permitiu a identificação desta proteína como o inibidor tecidual de metaloproteinases 2 (TIMP-2) (CALVETE *et al*., 1996; MCCAULEY *et al.*, 2001). Touros de maior fertilidade, definida como sendo o número de vacas prenhes 60 dias após o início da estação de cobertura, puderam ser discriminados daqueles de baixa fertilidade baseando-se na presença de HBP-24 ligada aos espermatozoides (BELLIN *et al*., 1996; 1998), mas as vias envolvidas na regulação da reprodução por essa via ainda não estão esclarecidas (MCCAULEY *et al.*, 2001). Contudo, Métayer et a.,2002, relataram que o TIMP-2 é sintetizado pelo testículo e está presente no fluido da cabeça do epidídimo do carneiro. Além do mais, TIMP-2 parece ativar o precursor da “matrix metaloproteinase” 2 (MMP2), que é uma das mais abundantes metalogelatinases presentes no epidídimo do carneiro. A MMP2 é sintetizada no testículo, principalmente pelas células de Sertoli, e é provável que atue no remodelamento da matriz extracelular durante o desenvolvimento gonadal (ROBINSON *et al.*, 2001). O TIMP-2 inibe a atividade da MMP2 (NAGASE *et al*.,1999), mas o significado deste fato em relação ao desenvolvimento testicular permanece indeterminado.

No estudo realizado por Martins et al., 2013, observou-se as RSVPs de 14 e 22 kDa foram detectadas como não tendo afinidade à heparina. Os testes de imunodetecção confirmaram que os RSVPs estão presentes na fração com proteínas sem afinidade a heparina. As BSPs se ligam eletrostaticamente à heparina através de aminoácidos básicos localizados nos domínios de fibronectina II, que interagem com os glicosaminoglicanos (CARDIN *et al*., 1989). No entanto, alguma substituição de aminoácidos poderia modificar a afinidade de tais estruturas pela heparina (WARD *et al*., 2010). Assim, é possível que as diferenças nas

sequências de aminoácidos dos domínios de fibronectina II nas RSVPs os impeçam da ligação com a heparina (MARTINS *et al*., 2013).

2.5 Método de purificação proteica: cromatografia

A escolha de um método para separar as proteínas uma das outras é baseado no tamanho e na composição químicas existentes entre os polipeptídios. A purificação de proteínas é vital para a caracterização da função, estrutura e interações das proteínas de interesse. Em geral uma substância que participa de menos de 0,1% do peso de um tecido seco é isolada até aproximadamente 98% de pureza.

Dentre os métodos modernos de análise química para purificação de proteínas, a cromatografia é um dos mais empregados, encontrando aplicações nos mais variados ramos da pesquisa científica e tecnológica, devido à capacidade que possui de separar espécies químicas, de forma seletiva e específica (MORAES *et al*, 2013). Cromatografia é o método físico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma das quais estacionária, enquanto a outra se movimenta numa direção definida. A mistura que contém os componentes a serem separados é dissolvida na fase móvel. Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, alguns componentes são fortemente retidos pela fase estacionária e por isso se movem lentamente com o fluxo da fase móvel; enquanto isso, outros componentes interagem fracamente com a fase estacionária, sendo transportados mais facilmente pela fase móvel. Os elementos da mistura podem ser separados e examinados qualitativamente e/ou quantitativamente, devido a mudanças na mobilidade, através da técnica de cromatografia em conjunto com outras técnicas experimentais, (COLLINS et al., 1990).

2.6 Cromatografia de afinidade

O isolamento seletivo e a purificação de enzimas e outras macromoléculas biologicamente importantes por cromatografia de afinidade exploram a propriedade biológica única destas proteínas para se ligar especificamente e reversivelmente (CUATRECASAS *et al.*,1968; JERIDA *et al*., 1969).

A grande variedade de proteínas que compõe as células pode ser estudada através das propriedades físico-químicas, no qual são fundamentais paras preparações homogêneas, com diferentes graus de pureza (COLLINS et al., 1995). As propriedades características de cada

proteína como peso molecular (cromatografia de exclusão molecular), polaridade (cromatografia de troca-iônica), carga superficial, hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica e de fase-reversa) e afinidade por ligantes (cromatografia de afinidade) (MORAES, 2013), são essências para distinguir e separar as proteínas umas das outras. Logo, foram desenvolvidos vários métodos para se purificar proteínas.

Na cromatografia líquida clássica ou cromatografia em coluna, a proteína a ser purificada é passada através de uma coluna contendo um polímero ou gel insolúvel ou uma matriz (resina) ao qual um inibidor ou ligante competitivo específico foi ligado covalentemente. A matriz é percolada com uma solução apropriada para aluir diferencialmente as proteínas de interesse. A escolha da solução ou eluente a ser utilizado na corrida cromatográfica, é baseado de acordo com a constituição da amostra (DEGANI *et al*., 1998). As diferentes proteínas migrarão através da coluna em velocidades diferentes, que dependerão do grau de interação com a matriz. Logo, as proteínas que não exibem uma afinidade apreciável pelo ligante passarão não retraídas através da coluna, enquanto que as que reconhecem o inibidor serão retardadas numa extensão relacionada com a constante de afinidade nas condições experimentais (CUATRECASAS, 1970). A coluna é parte fundamental no processo de cromatografia de afinidade, sendo responsável pela separação dos componentes presentes na amostra analisada. As colunas utilizadas, geralmente possuem diâmetro variando de 02 a 21 mm. As colunas de 2 mm possuem uma pressão ultraelevada (também chamados de UHPLC), as colunas de 4-6 mm são empregadas na grande maioria e as colunas com diâmetro em torno de 21mm são utilizadas de modo semi-preparativo (COLLINS *et al*, 2006).

A aplicação bem-sucedida do método requer que o polímero tenha uma interação mínima específica com as proteínas e exiba boas propriedades de fluxo para as condições de acoplamento e de eluição. Idealmente, a substância de gel deve formar uma rede muito solta, porosa, que permita a entrada e saída uniformes e desimpedidas de grandes macromoléculas (CUATRECASAS, 1970). Os derivados de agarose (Sepharose) (HJERTEN, 1962) são próximos do ideal (CUATRECASAS, 1970) devido à sua rede muito solta (PORATH, 1968; HJERTEN, 1962).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e processamento do plasma seminal ovino

O trabalho foi desenvolvido com 16 animais da raça Morada Nova, entre 2-4 anos, mantidos em sistema intensivo de produção, sob condições nutricionais uniformes, no setor de ovino-caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. Foram realizadas duas coletadas semanais de sêmen, com intervalo de três dias de descanso, através de eletro ejaculador, em um período de 6 meses. As amostras de sêmen foram misturadas (*pool*) com um inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA) logo após a coleta (MARTINS *et al*., 2013) e centrifugadas (700 x *g*, 4 ºC, 15 minutos) para separar os espermatozoides do sobrenadante. Este sobrenadante foi pipetado para tubos limpos e centrifugado novamente (5000 x *g*, 4 ºC, 60 minutos) para a retirada de *debris* e possíveis espermatozoides ainda existentes (SOUZA *et al*., 2010). Em seguida, as amostras de todos os animais foram agrupadas (*pool*) e acondicionadas em micro tubos, identificadas e armazenadas a -80 ºC até nova análise.

3.2 Precipitação com etanol do plasma seminal ovino

A precipitação do plasma seminal seguiu as recomendações de Bergeron (2005). Nove volumes de etanol puro, armazenado em baixa temperatura, foram adicionados a 15 mL de plasma seminal e deixados em agitação durante 90 min a 4 °C para precipitar as proteínas que foram então recuperadas por centrifugação a 10000 *g* durante 10 min. Após três lavagens subsequentes com etanol, os precipitados foram solubilizados em bicarbonato de amónio 50 mM e liofilizados. Aproximadamente 370 mg de pó seco foram recuperados. As proteínas liofilizadas foram ressuspendidas em 30 mL tampão de ligação (Sol. A: Tris 40 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH 7,4), e acondicionadas em 15 micro tubos de 2000 µl e mantidas a -80 ºC.

3.3 Quantificação da concentração de proteína total do plasma seminal

Inicialmente, uma curva analítica de calibração foi obtida a partir de soluções padrões, com concentrações de proteína conhecidas, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µg/mL de albumina sérica bovina (BSA). A cada 100 µl padrão, 2,5 mL do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) foram adicionadas, e as leituras de absorbância feitas a 595

nm (Ultraspec III, GE Lifesciences, Piscattaway, NJ, USA), após 10 minutos de incubação. A curva de calibração foi, então, estabelecida pelas médias das triplicatas das absorbâncias obtidas, gerando uma equação linear de absorbância versus concentração (R^2 = 0,9761) através da qual foi possível a determinação da concentração de proteínas totais do plasma seminal. Para quantificação da concentração de proteína na amostra, também em triplicata, estas foram previamente diluídas na proporção de 1:50 (v/v), em água ultra purificada (Millipore, Billerica, MA, USA) 20 µl da amostra diluída misturada com 1mL do reagente de Bradford. Após 10 minutos, leituras em 595 nm foram feitas e a média das triplicatas usadas para o cálculo da concentração de proteína do plasma seminal.

3.4 Cromatografia de afinidade à Gelatina

Foi determinada a concentração de proteína solúvel, (BRADFORD, 1976), aproximadamente, 12,3 mg/mL de proteína total, em que 6,15 mg/mL foram aplicados em cada corrida cromatográfica, respeitando a capacidade de retenção da coluna de gelatina (4,5 - 8,0 mg). Frações contendo 6,15 mg/mL de plasma seminal precipitado foram submetidas à cromatografia de afinidade à gelatina, utilizando uma matriz de Gelatin Sepharose 4B de 25 mL embalada numa coluna vazia XK 16/20 (GE Healthcare, EUA). A coluna foi equilibrada com tampão de ligação (Sol. A: Tris 40 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH 7,4) acoplado ao sistema cromatográfico Äkta Prime Plus (GE Healthcare, EUA). Foi aplicado baixo fluxo inicial de 1,0 mL/min de tampão de ligação para permitir que as proteínas de ligação à gelatina interajam com a coluna. Após 5 min, o fluxo foi acelerado para 2 mL/min e, a 40 min, as proteínas retidas foram eluídas utilizando 8 M de Uréia adicionados ao tampão de ligação. Após a cromatografia, foram determinados os picos contendo proteínas sem afinidade à gelatina e proteínas de ligação à gelatina. As frações que apresentaram ligação à gelatina, foram concentradas em filtros 10 kDa (VivaSpin MWCO 10000 Da, GE) e o material retido pelos filtros foi quantificado por meio de Bradford (1976). As frações sem afinidade à gelatina foram tratadas de forma semelhante. Para estimar o percentual de proteínas ligadas à gelatina foi realizado uma integração dos picos através do Software PrimeView Evaluation (GE Healthcare, USA) (RODRÍGUEZ-VILLAMIL *et al.*, 2016). A fração ligada à gelatina foi guardada para o passo de purificação seguinte à -20 ºC.

3.5 Cromatografia de afinidade à heparina com as proteínas ligadas à gelatina

Foi determinada a concentração de proteínas ligadas à gelatina e 1,72 mg/mL de proteínas ligadoras à gelatina foram aplicadas em cada corrida cromatográfica, diluídas em 100 mL de tampão de ligação (Sol. A: Tris 40 mM, $CaCl^2$ 2 mM, pH 7,4) respeitando a capacidade máxima de retenção da coluna de heparina (3 mg). A fração de proteínas com afinidade à gelatina foi separada por cromatografia de afinidade à heparina, utilizando uma coluna HiTrap Heparin HP de 5 mL (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), acoplada ao sistema cromatográfico Äkta Prime Plus (GE Healthcare, EUA). A coluna foi previamente equilibrada com tampão de ligação. Aplicou-se fluxo inicial de 0,5 mL/min de tampão de ligação para permitir que as proteínas de ligação à heparina interagissem com a coluna. Após 5 min, o fluxo foi acelerado para 1 mL/min e, a 30 min, as proteínas retidas foram eluídas utilizando NaCl 1M adicionado ao tampão de ligação. Após a cromatografia, foi gerado dois picos, correspondentes as proteínas sem afinidade à heparina e as proteínas de ligação à heparina. Os dois picos foram reunidos e concentrados utilizando filtros de 10 kDa (VivaSpin MWCO 10000 Da, GE), em que a concentração de proteínas retidas no filtro foi determinada por meio de Bradford (1976). Para estimar o percentual de proteínas, foi realizada uma integração dos picos e analisados através de Software PrimeView Evaluation (GE Healthcare, USA). (RODRÍGUEZ-VILLAMIL *et al.*, 2016). A concentração das proteínas retidas e não reditas à heparina foram de, aproximadamente, 1,2 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente. As duas frações foram armazenadas a -20 ºC para seguir com as análises.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e análise computacional em gel

Para a eletroforese unidimensional, utilizou-se um volume contendo 10 µg de proteínas de cada uma das frações resultantes da cromatografia de afinidade as colunas de gelatina e à heparina e misturou-se com 10 µg tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS a 4%, 20% (v / v) Glicerol, DTT 0,2 M, azul de bromofenol a 0,02%), fervida durante 90s, e carregada nos poços de um gel de empilhamento (4% de acrilamida), colocada sobre um gel de poliacrilamida com gradiente de 12,5%. Uma quantidade igual de proteínas seminais também foi aplicada como controle. Em um poço de gel de empilhamento, foram carregados 6 µl de mistura padrão de peso molecular de 225-12 kDa (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) para permitir a estimativa do peso molecular das bandas proteicas.

Uma corrente de 25 mA por gel foi aplicada durante 2 h para fazer as proteínas migrarem lentamente através do gel de empilhamento. O gel foi corado com Azul Brilhante de Coomassie (CBB-R250) durante 12h, e descorado após várias lavagens numa solução

contendo metanol (40%), ácido acético (10%) em água bidestilada (RODRIGUES *et al.*, 2013). Após a descoloração, o gel foi digitalizado a 300 dpi (Image Scanner, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) e guardado como um ficheiro TIFF. Os mapas de proteínas unidimensionais foram analisados utilizando o software Quantity One®, v.4.6.3 (Bio-Rad, Rockville, MD, EUA). A imagem do gel foi transformada e uma área de corte determinada para exibir apenas as *lanes* e bandas, sem artefatos de borda. Em seguida, o fundo de gel foi subtraído utilizando a ferramenta de faixa de fundo, e a imagem foi filtrada, utilizando uma distribuição de densidade *outlier* e um filtro 9 × 9. As *lanes* foram enquadradas e as bandas foram detectadas pelo *software*. As *lanes* foram revisadas individualmente através do visualizador em 3D VIEWER, e as bandas não detectadas pelo programa foram adicionadas manualmente. O peso molecular de cada banda foi determinado de acordo com os marcadores de peso molecular, utilizando um modelo de regressão ponto a ponto disponível no software Quantity One (Bio Rad, USA).

3.7 Imunodetecção de BSPs ovinas em frações de proteínas de plasma seminal com ou sem afinidade para gelatina e heparina

Cinco microlitros de plasma seminal e vinte microlitros das frações retidas e não retidas nas colunas de gelatina e heparina foram sujeitas a separação de acordo com o peso molecular por SDS-PAGE 1D em géis de acrilamida a 12,5% e depois transferidas (a 45 mA durante 90 min) para membranas de PVDF (Hybond-P, GE Lifesciences, EUA) utilizando uma unidade transferência TE 70 (GE Healthcare, EUA). As membranas foram bloqueadas durante a noite e incubadas com anticorpo primário como descrito anteriormente por Souza *et al.*, 2012, a 4 ºC com 30 mL de PBS com Tween-20 a 0,5% (PBS-T, GE, Healthcare) contendo leite desnatado (5% p/v), sob agitação suave, seguido por uma incubação de 1 h com anticorpo contra o ligante de proteína de espermatozoide (1: 6000 para anti-BSP), cedidos, gentilmente, pelo Dr. Puttaswamy Manjunath (Departamento de Medicina, Universidade de Montréal, Canadá) com base no Protocolo descrito por (MOURA *et al.*, 2007), com modificação.

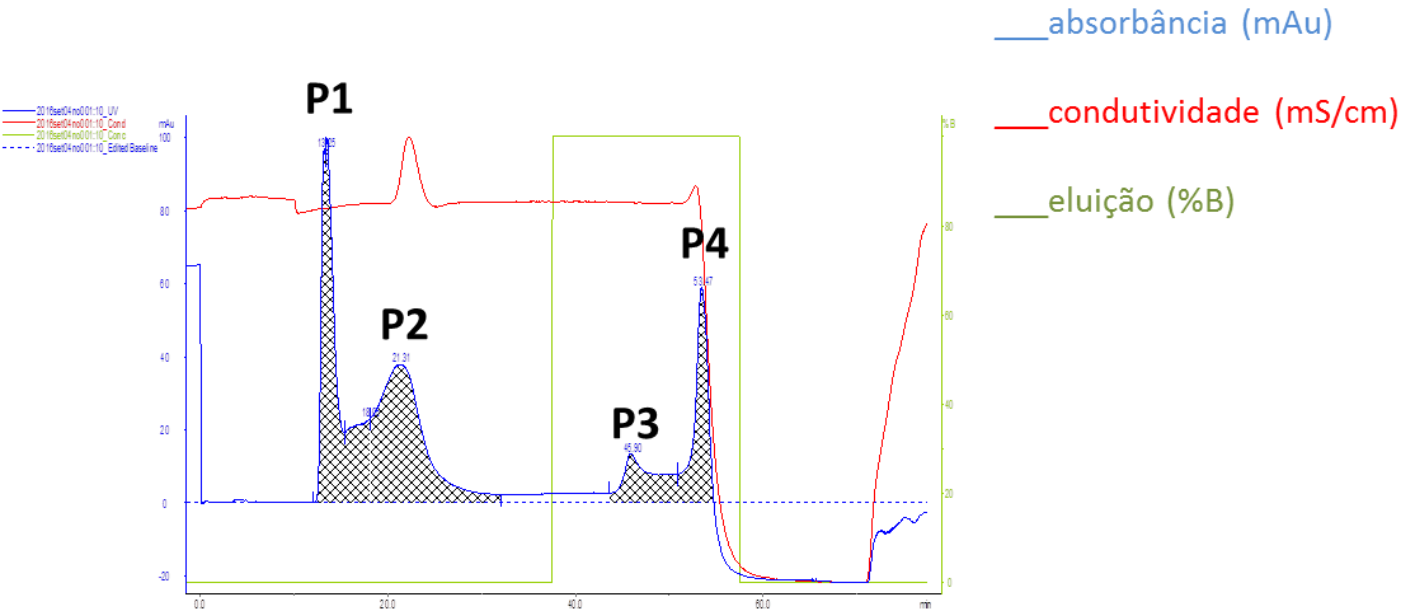
As membranas de PVDF foram então lavadas três vezes em PBS-T e incubadas durante 1 h com IgG anti-coelho (1: 5000, Abcam, UK) juntamente com 30 mL de PBS com Tween-20 a 0,5% (PBS-T, GE, Healthcare), lavadas novamente três vezes em PBS-T e lavadas uma vez com Tris -HCl (50mM). A imunorreação foi visualizada por exposição das

membranas ao substrato de fosfatasse alcalina BCIP / NBT, pH 9,5 (Thermo Scientific, EUA). A reação foi interrompida por lavagem das membranas com água ultrapura.

4 RESULTADOS

A figura 1 mostra o perfil cromatográfico das proteínas com e sem afinidade à gelatina do plasma seminal de ovinos. As condições cromatográficas foram eficientes para separar as proteínas plasmáticas seminais em quatro picos, dos quais os dois primeiros picos (P1 e P2) foram eluídos durante a lavagem da coluna com de tampão de ligação, em 30 min, com absorbâncias de 100 mAu e 40 mAu, respectivamente. Os dois últimos picos, agrupados em P3 e P4, foram eluídos na presença de 8 M de ureia , aos 60 min, com uma absorbância de 18 mAu e 60 mAu, respectivamente. Os dois últimos picos representaram 35% do total de proteínas do plasma seminal de *Ovis aries* que se ligaram à gelatina. Através das analises, como a absorbância e a eletroforese, chegou-se à conclusão que se deveria trabalhar com o último pico (P4), simbolizando o pico de interesse, com um total de 28,44% de proteínas ligadas à gelatina.

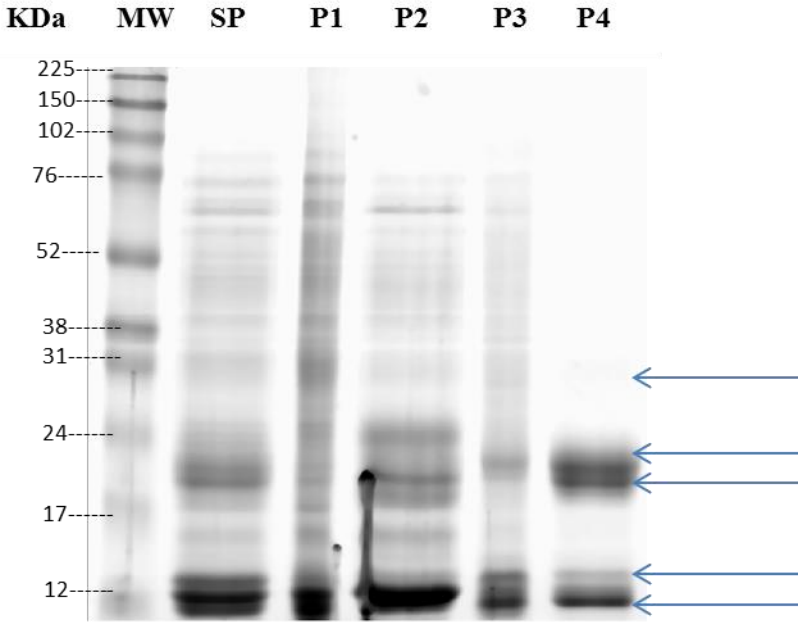
Figura 1 – Cromatográfica de afinidade à gelatina com proteínas do plasma seminal de ovinos.



Cromatografia de afinidade a gelatina de proteínas plasmáticas seminais inteiras em que P1 e P2 representam as proteínas sem afinidade à gelatina e P3 e P4 representam as proteínas com ligação à gelatina.
Fonte: o Autor.

A avaliação por SDS-PAGE 1-D das proteínas ligadas à gelatina a partir de proteínas plasmáticas seminais inteiras, com apoio do aplicativo Quantity One (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), (FIGURA 2).

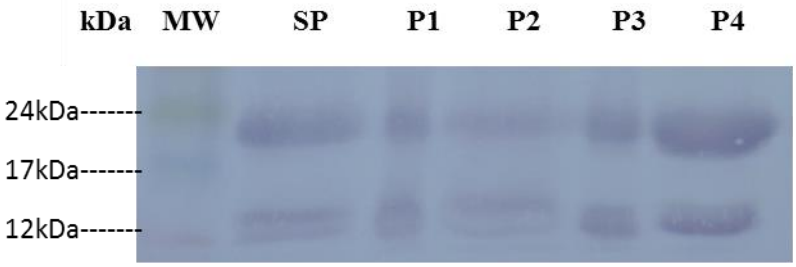
Figura 2 - SDS-PAGE 1-D com proteínas ligadas e não ligadas à gelatina, em que as setas em azul apontam na fração P4 a presença de 5 bandas proteicas com pesos moleculares entre 12kDa e 30kDa.



P1 e P2 representam as proteínas sem afinidade à gelatina e P3 e P4 representam as proteínas com ligação à gelatina. SP presentou a fração de plasma seminal utilizado como controle.
Fonte: o Autor.

Observou-se com a imunodetecção através do Western Blot que a fração não retida da coluna de gelatina continha certa quantidade de proteínas com uma massa molecular semelhante aos das proteínas ligadas à gelatina (FIGURA 3). Acredita-se que não é provável que essas proteínas sejam BSPs ovinas, mas outras proteínas do mesmo peso molecular contidas no plasma seminal, uma vez que não se ligaram à gelatina (VILLEMURE *et al.*, 2003) ou ainda proteínas desnaturadas. Alternativamente, certas quantidades de proteínas BSPs poderiam estar na forma agregada ou associada com fosfolipídios e assim não seriam capazes de ligarem-se à coluna.

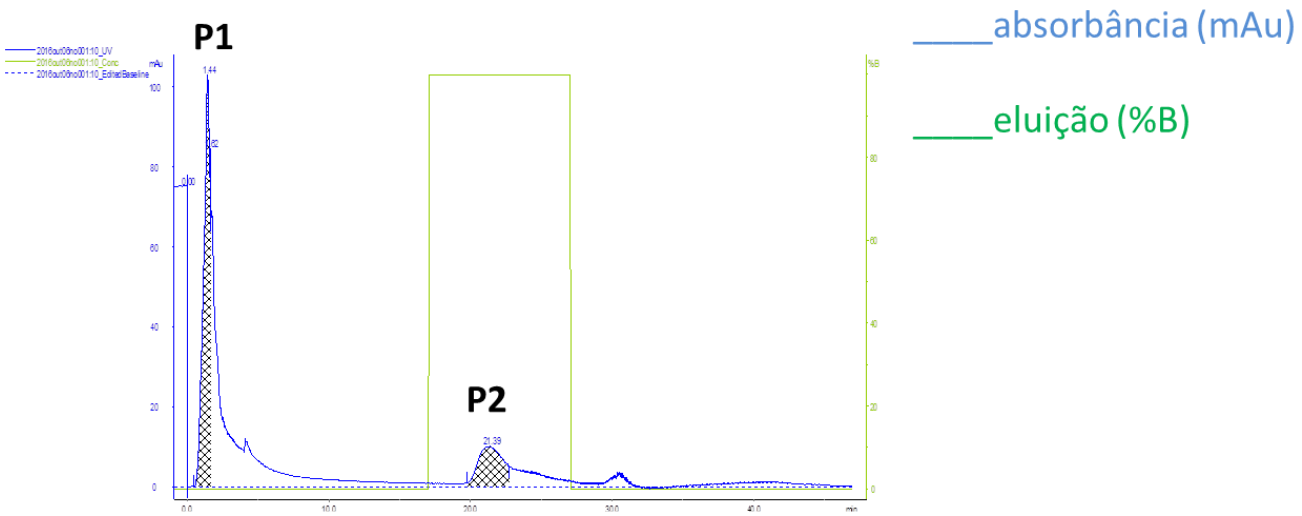
Figura 3 - Membrana PVDF imunizada contra anticorpo Anti-*Binder of SPerm* ovino com proteínas ligadas e não ligadas à gelatina oriundas do plasma seminal de ovinos.



P1 e P2 representam as proteínas sem afinidade à gelatina e P3 e P4 representam as proteínas com ligação à gelatina. SP presentou a fração de plasma seminal utilizado como controle.
Fonte: o Autor.

As proteínas da fração P4 foram aplicadas ao sistema cromatográfico Akta Prime Plus (GE Healthcare, EUA) acoplado a uma coluna de afinidade de heparina-Sepharose. As condições cromatográficas foram eficientes para separar as proteínas em dois picos, agrupados em P1 e P2, em que P1 foi eluído na presença de tampão de ligação e P2 foi eluído em tampão de ligação com acréscimo da NaCl 1 M. As proteínas contidas em P1 foram eluídas em 10 min de corrida cromatográfica com uma absorbância de 100 mAu e as proteínas inclusas em P2 foram eluídas em 30 min com uma absorbância de 15 mAu (FIGURA 4). O primeiro pico representou 69,95% do total de proteínas não ligadas à heparina e o segundo pico caracterizou 30,04% das ligadas à heparina.

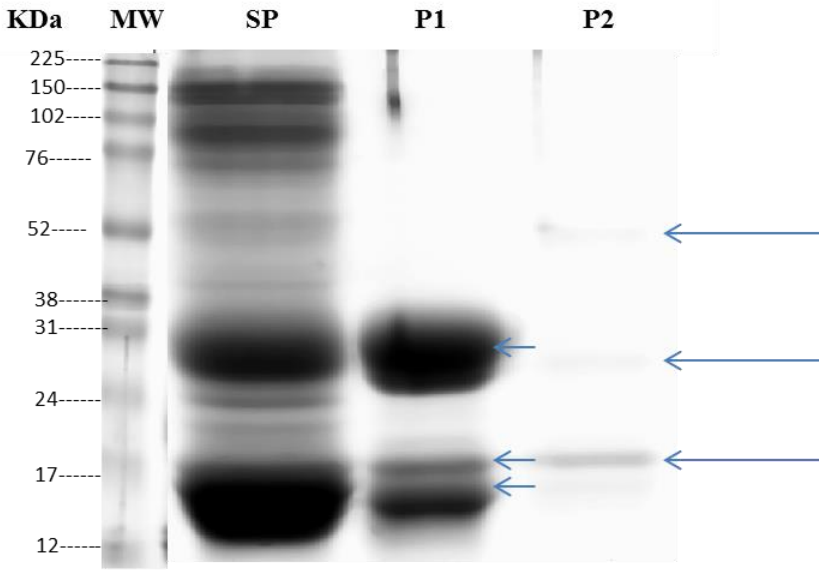
Figura 4 - Cromatográfica de afinidade à heparina com proteínas contidas na fração P4 ligadas à gelatina.



Cromatografia de afinidade com heparina de proteínas de ligação à gelatina obtida no passo cromatográfico anterior, em que P1 e P2 representam as proteínas sem afinidade a heparina e com afinidade a heparina, respectivamente.
Fonte: o Autor.

A análise dos géis foi realizada com auxilio do aplicativo Quantity One (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), das proteínas retidas e não retidas da coluna de heparina a partir da fração P4 ligada à gelatina (FIGURA 5).

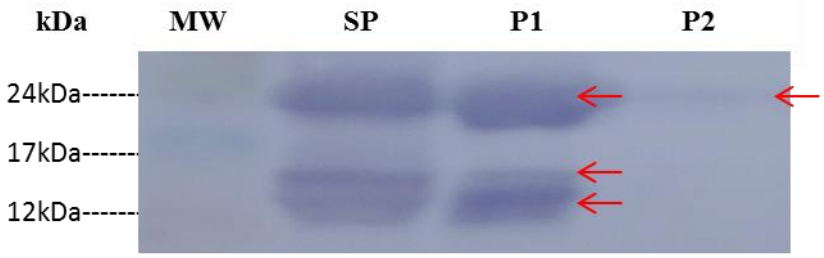
Figura 5 - SDS-PAGE 1-D com proteínas ligadas e não ligadas à heparina, em que as setas em azul apontam a presença de 3 bandas proteicas com pesos moleculares entre 14 kDa e 24 kDa na fração P1, e 3 bandas proteicas com pesos moleculares entre 15 kDa e 52 kDa na fração P2.



P1 e P2 representam as proteínas sem afinidade a heparina e com afinidade a heparina, respectivamente. SP presentou a fração de plasma seminal utilizado como controle.
Fonte: o Autor.

Imunodetecção por Western blot utilizando 20 µl das frações P1 e P2 da coluna de heparina a partir da fração P4 ligada à gelatina, utilizando anticorpos contra as BSPs ovinas (1: 1000 para anti-BSP) (FIGURA 6).

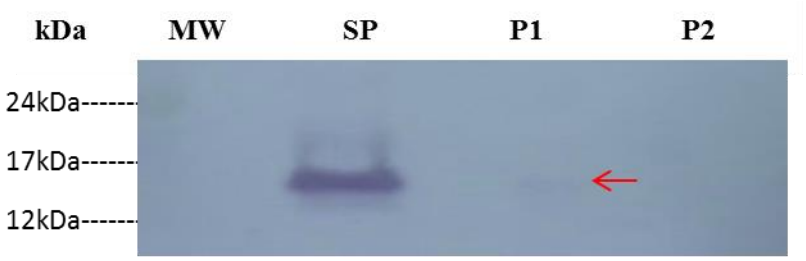
Figura 6 - Membrana PVDF imunizada contra anticorpos Anti-*Binder of SPerm* ovino com proteínas ligadas e não ligadas à heparina, em que as setas em vermelho apontam uma marcação específica para BSPs, nas duas frações.



Proteínas oriundas da fração P4 da gelatina, agrupados em P1 e P2, representando as frações sem ligação à heparina e com ligação à heparina. SP presentou a fração de plasma seminal utilizado como controle.
Fonte: o Autor.

Para estimar a quantidade de BSPs nas frações P1 e P2, foi realizado um segundo teste de imunodetecção utilizando o anticorpo anti-Bodesina 1(1: 1000 para anti- rBdh-1), (FIGURA 7). SDS-PAGE utilizado para o Western Blot foi dividido em 4 poços, em que a primeiro correspondeu ao marcador molecular, o segundo ao plasma seminal ovino, o terceiro a fração P1 e o quarto a fração P2.

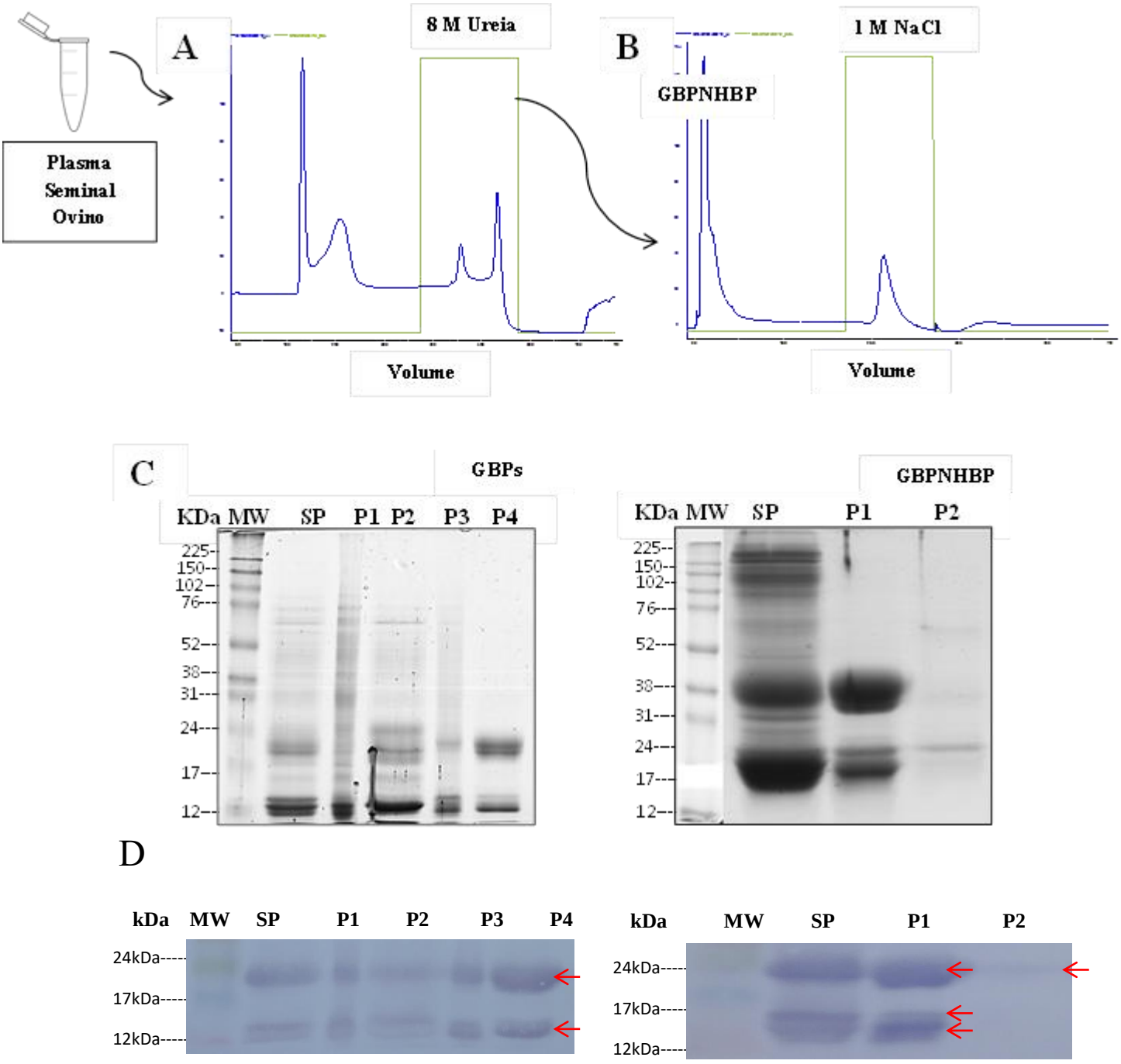
Figura 7 - Membrana PVDF imunizada contra anticorpos Anti- rBdh-1 com proteínas ligadas e não ligadas à heparina, em que a seta vermelha aponta uma leve marcação para a presença de espermadesinas, somente, na fração P1.



Proteínas oriundas da fração P4, agrupadas em P1 e P2, representeando as frações sem afinidade à heparina e com afinidade à heparina. SP presentou a fração de plasma seminal utilizado como controle.
Fonte: o Autor.

A estrutura da figura 8 ilustra a estratégia utilizada para purificação das RSVPs de 14 e 22 kDa do plasma seminal ovino precipitado, em que a figura 8A representou a cromatografia de afinidade à gelatina de proteínas plasmáticas seminal inteiras. A figura 8B representou a cromatografia de afinidade à heparina com proteínas ligadas à gelatina obtidas no passo cromatográfico anterior (8A). Os géis das figuras 8C demonstraram a presença de diversas bandas proteicas no plasma seminal de ovinos Morada Nova, em que as proteínas de interesse estão contidas na fração P4 da coluna de gelatina e na fração P1 da coluna de heparina. A figura 8D, representa as membranas de PVDF imunizadas com anticorpo contra BSPs ovinas das frações da coluna de gelatina e heparina.

Figura 8 - Estratégia cromatográfica aplicada para purificação de BSPs ovinas a partir do plasma seminal de Morada Nova.



(A) Cromatografia de afinidade de gelatina de proteínas plasmáticas seminais inteiras. (B) Cromatografia de afinidade com heparina de proteínas de ligação à gelatina obtida no passo cromatográfico anterior (A). (C) Eletroforese unidimensional do plasma seminal total de ovinos Morada Nova com todas as frações das coluna de gelatina e heparina. (D) Western Blot das frações das colunas de gelatina e heparina. SP presentou a fração de plasma seminal utilizado como controle.
Fonte: o Autor.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram purificadas parcialmente duas proteínas do plasma seminal ovino que são homólogas da família BSP de proteínas em bovinos, ligadas aos processos de capacitação espermática e reação acrossômica (BARRIOS *et al*.,2005; FERNÁNDEZ-JUAN *et al*., 2006; MUIÑO-BLANCO *et al*., 2005). Utilizou-se a propriedade de ligação das BSPs à gelatina, para capturar por cromatografia de afinidade as RSVP 14 kDa e 22 kDa. A propriedade de ligação à gelatina das proteínas BSPs é devida à presença de dois domínios de Fibronectina II na sua estrutura (MANJUNATH *et al*., 1987, CALVETE *et al*., 1996). As RSVPs de 14 kDa e 22 kDa estão entre as proteínas mais abundantes no plasma seminal de carneiros representando, respectivamente, 6,6 e 5,0% da intensidade total dos *spot*s detectados (RÊGO, 2010).

Conforme Rêgo (2010), a sequência peptídica juntamente com os resultados oriundos da espectrometria de massas, apresentou-se inserida nos domínios de fibronectina II (RSVP14) ou pelo menos em um dos domínios (RSVP22). A RSVP14 e RSVP22 ligam-se à membrana plasmática dos espermatozoides durante a ejaculação, sendo que a segunda com intensidade menor conforme os resultados encontrados no estudo de Van Tilburg *et al*., 2011.

Foi demonstrado que as proteínas BSPs e os seus homólogos em garanhões, bodes e bisões ligam-se à gelatina (MANJUNATH *et al*., 1987, CALVETE *et al*., 1995a, JONAKOVA *et al*., 1998, VILLEMURE *et al*., 2003), devido aos domínios de Fibronecina II que lhes conferem a propriedade de se ligarem ao colágeno. Em outros estudos, foram demonstradas as capacidades de ligação à gelatina de homólogos das proteínas BSPs pB1 de javali e HSP-1 e HSP-2 de garanhão (CALVETE *et al*., 1995; JONAKOVA *et al*., 1998) compartilhados, também, por todas as BSPs e seus homólogos encontrados em ovinos (MANJUNATH *et al*., 1987). Ainda, as sequências de aminoácidos completas, juntamente com a atribuição de ponte dissulfeto, devem confirmar a similaridade estrutural das BSPs com as proteínas do plasma seminal de ovinos. A cromatografia de afinidade à gelatina representa uma estratégia para purificação de homólogos em algumas espécies de mamíferos, uma vez que estas proteínas RSVPs se ligam à gelatina, indicando a presença de domínios de Fibronectina II, como foi demostrado no estudo.

A princípio utilizou-se, no presente estudo, uma coluna de afinidade à gelatina-Sepharose seguida por uma coluna de afinidade à heparina-Sepharose, onde a separação foi realizada em um sistema cromatográfico automatizado. As proteínas foram eluídas em quatro picos: não adsorvido (P1), fração retardada (P2) e fração adsorvida (P3 e P4). A proporção de

proteínas encontradas nas frações P1, P2, P3 e P4 foram de aproximadamente 40:20:10:30, respectivamente. A recuperação de proteínas totais foi cerca de 35% do material de partida após cromatografia de gelatina-Sepharose, levando em consideração somente P3 e P4 (FIGURA 1). Neste estudo, o grupo das proteínas com uma massa molecular de 14-15 kDa e 22-24 kDa foram as mais predominantes na fração contendo as proteinas ligadas à gelatina. A eletroforese unidimencional das frações P1, P2, P3 e P4 indicaram a presença de 28 proteínas com massas moleculares entre 14 a 102 kDa (FIGURA 2), semelhante aos resultados encontrados por Bergeron *et al*., 2005. As frações P1 e P2 abrangeu as proteinas sem afinidade à gelatina com massas moleculares entre 12 kDa –73 kDa, resultado esperado, pois P1 e P2 sobrepõem-se parcialmente, como, também, encontrado por Bergeron *et al*., 2005. Na fração P3, foram detectadas 6 bandas com pesos moleculres entre 12 kDa – 63 kDa, e na fração P4, foi observado a presença de 5 bandas proteicas, com massas moleculares de 14, 15, 22, 24 e 30 kDa, que foram nomeadas por RSVP-14 kDa, RSVP-15 kDa, RSVP-22 kDa , RSVP-24 kDa (BERGERON *et al*.,2005) e GBP 30 kDa, de acordo com os pesos moleculares.

Foi realizado o teste de imunodetecção com anticorpos contra BSP ovina (FIGURA 3) dos quatro picos da coluna de gelatina, onde foi observado marcação para BSPs em todos os picos. Este resultado concordou com o estudo de Villemure *et al*., 2003, o qual sugere que provalmente estas proteínas contidas nas frações P1 e P2 não sejam BSPs, mas outras proteínas do mesmo peso molecular contidas no plasma seminal ou ainda proteínas que foram desnaturadas. Alternativamente, certas quantidades de proteínas BSPs ovinas poderiam estar na forma agregada ou associada com fosfolipídios e assim não seriam capazes de ligar-se à coluna.

As proteínas BSPs são conhecidas por se ligarem à heparina e atuar na capacitação espermática induzida pela heparina nos espermatozoides bovinos (CHANDONNET *et al*., 1990, MILLER *et al*., 1990, THERIEN *et al*., 1999). A ligação à heparina é feita através de aminoácidos básicos dentro da sequência de proteínas com os grupos ácidos em heparina como glicosaminoglicanos (CARDIN *et al*., 1989). Essa interação é considerada importante para o processo de capacitação de espermatozoides (THÉRIEN *et al*., 1995). Martins *et al*., 2013, descreveram que as RSVPs de 14 e 22 kDa não tinham afinidade à heparina, pois os resultados de Western blots confirmaram que as RSVPs estavam presentes na fração com proteínas sem afinidade à heparina. Homólogos das BSPs de outras espécies, tais como bodes (VILLEMURE *et al*., 2003) e bisões (BOISVERT *et al*., 2004) também não se ligam à heparina. Substituições de aminoácidos podem modificar a afinidade de tais estruturas à

heparina (WARD, 2010), assim, é possível que as diferenças nos aminoácidos e nas sequências de domínios de Fibronectina II nas RSVPs os impeçam de se ligarem à heparina (MARTINS *et al*., 2013).

No presente estudo, as RSVPs, contidas na fração P1, de 14 kDa, 15 kDa e 24 kDa não se ligaram à heparina, similar ao encontrado no estudo de Villemure *et al*., 2003 e as proteínas de 15,5 kDa, 24 kDa e 52 kDa se ligaram a heparina (FIGURA 4). A sequência do N-terminal da proteína de 24 kDa das frações retidas e não retidas pela coluna de heparina, indicou que ambas as bandas têm sequência N-terminal idênticas, apontando que são uma mesma proteína de 24 kDa (BERGERON *et al.*,2005). Até o presente, nenhum dos domínios de Fibronectina II das proteínas BSPs mostraram-se serem glicosiladas, embora as extensões amino-terminais de algumas proteínas da família BSP sejam glicosiladas em resíduos Ser/Thr (MANJUNATH *et al*., 1987). Várias glicoformas de uma proteína podem apresentar diferentes tempos de retenção durante as corridas cromatográficas (MANJUNATH *et al*., 1987). De forma semelhante, foi observado no estudo em que a RSVP 24 kDa está presente na fração retardada e na fração adsorvida da heparina-Sepharose (FIGURA 4). A análise de imunodetecção utilizando anticorpo contra BSP ovina confirmou a presença de BSPs nas frações sem afinidade à heparina e com afinidade à heparina, o que sugere a presença da RSVP24, nas duas frações (FIGURA 5).

Ao analisar o gel da figura 4 e o Western Blot da figura 5, observou-se que, provavelmente, a RSVP22 não estava presente na fração de proteínas sem afinidade à heparina. Segundo os resultados SDS-PAGE de Villemure *et al*., 2003, a comparação da sequência N-terminal da RSVP22 e RSVP24, indicou algumas diferenças ao longo da sequência N-terminal, mas mostraram elevado grau de relação estrutural entre as RSVPs. Além disso, a comparação das proteínas RSVP22 e RSVP24 com proteínas GSP 20 kDa e GSP 22 kDa de plasma seminal de bodes indicaram que elas também partilham elevado grau de semelhança entre si. Isto sugere a existência de diferentes glicoformas da RSVP24 em plasma seminal ovino, o que comprova que as proteínas RSVPs existem em várias formas moleculares e glicoformas, portanto, somente a espectrometria de massas confirmaria a presença da RSVP24.

De acordo com Bergeron *et al*., 2005 e Cardozo *et al*., 2006, as proteínas com pesos moleculares entre 14-24 kDa foram as mais predominantes no plasma seminal ovino e que a proteína principal do plasma seminal ovino é uma espermadesina de 15,5 kDa, o que representa 45% das proteínas plasmáticas seminais totais. Além disso, a espermadesina ovina de 15,5 kDa apresenta atividade de ligação à heparina (FIGURA 4). Devido a capacidade de

ligação à heparina, acredita-se que a espermadesina de 15,5 kDa ovina possa desempenhar papel semelhante na capacitação de espermatozoides ou na ligação do espermatozoide ao epitélio do oviduto ou à zona pelúcida. A região N-terminal desta proteína tem alta similaridade com a sequência de espermadesina de javali AQN-1 (71%) e Bodesina2 (93%). As Bodesinas encontradas no plasma seminal de bodes mostraram similaridade com AQN-1 (~ 70%), assim, é possível que a espermadesina detectada no plasma seminal de ovinos Morada Nova (MARTINS *et al*., 2013) tenham papeis semelhantes aos encontrados em Bodhesina2 de bodes e suínos AQN-1 (TOPFER-PETERSEN *et al*., 1998, 2000, 2008; EKHLASI-HUNDRIESER *et al*., 2005).

Para entender se a banda de 15,5 kDa na fração com afinidade à heparina se tratava de uma espermadesina, foi realizado um Western Blot, com anticorpo contra Bodesina1 (FIGURA 6), onde foi observada uma leve marcação na fração de proteínas sem afinidade à heparina e nenhuma marcação na fração com afinidade à heparina. O resultado indicou que a fração de 15,5 kDa poderia não ser uma espermadesina ao operar com anticorpo contra Bodesina1. Utilizando anticorpo contra Bodesina2, observou-se marcações de proteínas com baixo peso molecular nas frações com e sem afinidade à heparina, (MARTINS *et al.*, 2013), o mesmo resultado foi encontrado por Teixeira *et al.*, 2006, ao estudar plasma seminal de bodes.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo descreve metodologias em cromatografia de afinidade para purificação da BSPs do plasma seminal ovino. Demonstra-se, desta forma, que a RSVP de 14 kDa esta' presente nas frações com afinidade à gelatina e sem afinidade à heparina, enquanto que a RSVP de 22 kDa foi detectada somente na fração com afinidade à gelatina. Dadas estas características das RSVPs, conclui-se que os métodos cromatográficos foram eficientes para capturar as duas RSVPs de amostras de plasma seminal de ovinos. No entanto, a aplicação de abordagens cromatográficas adicionais ainda são necessárias para obter estas proteínas com maior grau de pureza do que o obtido no presente estudo. Assim a partir da purificação dessas proteínas e após testes *in vitro* avaliando o efeito dessas proteínas sobre a capacitação espermática e reação acrossômica estas poderão ser utilizadas em criopreservação e/ou meio de fertilização *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.P.; CRISTINELLI, M.J.; SQUIRES, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. Equine Reproduction IV. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v. 35, p. 113-120, 1987.

ATREJA, S.K.; GANDHI, K.K. Goat sperm phospholipases. **Indian Journal of Dairy Science**, Karnal, v. 45, p. 246, 1992.

BARRIOS, B. *et al.* Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**, Zoragoza, v. 63, p. 1531-1537, 2000.

BARRIOS, B. *et al*. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 27, p. 588– 595, 2005.

BELLIN, M.E. *et al*. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science,** v. 76, p. 2032-2039, 1998.

BELLIN, M.E. *et al.* Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science,** v. 74, p. 173-182, 1996.

BELLIN, M.E.; HAWKINS, H.E.; AX, R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2441-2448, 1994.

BERGERON, A. *et al.* Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 71, p. 461– 470, 2005.

BENOFF, S. *et al.* Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. **Human Reproduction**, Oxford, v. 8, p. 2141-2154, 1993.

BRADFORD M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, p. 1915-1925, 2001.

BOISVERT, M. *et al*. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 656–661, 2004.

CABALLERO, I. *et al*. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies . **Reproduction in Domestic Animals** , v. 47, p. 12 21, 2012.

CALVETE, J.J. *et al.* Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemical Journal**. v. 310, p. 615–622, 1995.

CALVETE, J.J. *et al.* The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 399, p. 147-152, 1996.

CARDIN, A.D.; WEINTRAUB, H.J. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. **Arteriosclerosis**, v. 9, p. 21–32, 1989.

CARDOZO, J.A. *et al.* Identification of rsvp14 and rsvp20 components by two dimensional electrophoresis and western-blotting. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 43, p. 15-21, 2008.

CARDOZO, J.A. *et al.* Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, p. 841-850, 2006.

CAVALCANTE, J.M.M. *et al*. Plasma seminal ovino e sua aplicação na biotecnologia reprodutiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, p. 254-259, 2013.

CHANDONNET, L. *et al*. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular of Reproductio**, v. 26, p. 313–318, 1990.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.

COLLINS, H. C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da Unicamp, p. 279, 1990.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, p.452, 2006.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 59, p. 7-11, 1998.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFIXSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U. S. A., v. 61,p. 636, 1968.

CUATRECASAS, P. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. **The Journal of Biologic**, v. 245, 1970.

DEGANI A.L.G.; CASS Q.B.; VIEIRA P.C. Cromatografia, um breve ensaio. **Química uma nova escola**. nº 7, maio, 1998.

DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 3, p. 175-194, 1997.

DE KRETSER, D.M.; KERR, J.B. The cytology of the testis. **The Physiology of Reproduction**, New York, v. 9, p. 1177-1290, 1994.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholip ase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10149–10155.10155, 1992.

DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 37, p. 425- 435, 1994.

DIAMANDIS, E.P. *et al*. Seminal plasma biochemical markers and their associations with semen analysis findings. **Urology**, Amsterdam, v. 53, p. 596-603, 1999.

ESCH, F.S. *et al.* Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 113, p. 861–867, 1983.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.A. Salamon's artificial insemination of sheep of goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 194, 1987.

FAN, J.; LEFEBVRE, J.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: a new expanding superfamily in mammals. **Gene**, v. 375, p. 63–74, 2006.

FAVARETO, A. P.A. *et al.* Identification of the SP22 sperm protein in Santa Inês and Dorper rams. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 45, p. 323-30, 2008.

FERNÁNDEZ-JUAN, M. *et al*. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 132, p. 721–732, 2006.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FRANÇA, L.R.; RUSSEL, L.D. The testis of domestic mammals. **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Europe, 1998.

FIRST, N.L.; PAMSH, J.J. In-vitm fertilization in ruminants**. Journal Reproduction Fertility**, v. 34, p. 151-165, 1987.

GILMONT, R.R. *et al.* Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. **Biology of Reproduction,** Madison, v. 43, p. 151–157, 1990.

GWATHMEY, T.M.. *et al.* Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, an BSP-30kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 75, p. 501-507, 2006.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 69, p. 809-815, 2003.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Manole Ltda, 2004.

HANDROW, R.R.; LENZ, R.W. Structural comparison among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 107, p. 1326-1332, 1982.

HENAULT, M.A. *et al*. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona -free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 52, p. 390-397, 1995.

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v. 108, p. 199-204, 1996.

HJERTEN, S. **Archives Biochemistry Biophysics**.v. 99, p.446, 1962.

ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of spermcapacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian J. Androl**, v. 14, p. 816–821, 2012.

JERINA, D. M.; CUATRECASAS, P. *In:* PROCEEDINGS OF THE IV INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACOLOGY, Basel, Switzerland, July, v. 1, 1969.

JOBIM, M. I. M. *et al*. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 31, p. 21-30, 2003.

JOBIM, M.I.M. *et al*. BSP A1/A2 like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 63, p. 2053-2062, 2005.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v. 6, p. 11-19, 2009.

JONAKOVA, V. *et al.* Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 25–34, 1998.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction,** Madison, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

LA FALCI, V.S.N. *et al.* Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v. 57, p. 1035-1048, 2002.

LEE, C.N. *et al*. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. **Gamete Research**, v. 12, p. 345-355, 1985.

LEDESMAA, A. *et al*. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 173, p. 35–41, 2016.

LUSIGNAN, M.F. *et al*. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 76, p. 424-432, 2007.

MANJUNATH, P. *et al*. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 27–37, 1994.

MANJUNATH, P. *et al.* New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 394–397, 2009.

MANJUNATH, P. *et al*. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M.R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reports**, New York, v. 7, p. 231-238, 1987.

MANJUNATH, P., SAIRAM, M.R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemical Journal**, v. 241, p. 685-692, 1987.

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

MANJUNATH, P.; MARCEL, Y.L.; UMA, J., SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., CHAPDELAINE, A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. **Biochemical Journal**, v. 264, p. 16853–16857, 1989.

MANJUNATH, P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. **World Science Publishing**, v. 12, p. 49– 61, 1984.

MARKS, J.L.; AX, R.L. Relationship of non-return rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2078-2086, 1985.

MARTINS J.A.M. Desenvolvimento reprodutivo e análise das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina, em tourinhos Gir selecionados para a produção de leite. 2010. 70f. Tese (Doutorado Ciência Animal), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

MARTINS, J.A.M. *et al.* Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminant**, v. 27, p. 113-115, 2013.

MARTINEZ, P.; MORROS, A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 1, p. 103-117, 1996.

MCCAULEY, T.C. *et al*. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 336-341, 2001.

MCCAULEY, T.C. *et al*. Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 145-153, 1999.

MCCAULEY, T.C.; BELLIN, M.E.; AX, R.L. Localization of a heparin-binding protein to distinct regions of bovine sperm. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 429-438, 1996.

MEIZEL, S.; TURNER, K.O. Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of golden hamster sperm in vitro. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, p. 137-139, 1986.

MERI, S.; JARVA, H. Complement regulatory proteins. **Nature Encyclopedia of Life Sciences**, v. 7, p. 1-7, 2001.

MÉTAYER, S. *et al*. Comparison, characterization and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals: matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1219-1229, 2002.

MÉTAYER, S. *et al*. Physiological and enzymatic properties of the ram epididymal soluble form of angiotensin I-converting enzyme. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 65, p. 1332-1339, 2001.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 42, p. 899-915, 1990.

MILLER, D.J.; HUNTER, A.G. Effect of osmolality and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction and in vitro fertilization of bovine ejaculated sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2915-2924, 1986.

MORAES, C.S. *et al*. Métodos experimentais no estudo de proteínas. **Biologia celular e molecular**, Rio de Janeiro, p. 84, 2013.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1487, p. 24-32, 2000.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1438, p. 175-184, 1999.

MOREAU, R. *et al.* Type II domains of BSP-A1/-A2 proteins: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. **Biochemical and Biophysical**, Amsterdam, v. 246, p. 148-154, 1998.

MOURA, A.A.; SOUZA, C.E.A.; GARCIA, F.C.H. Desenvolvimento ponderal e testicular em carneiros Santa Inês no estado do Ceará. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1999, Porto Alegre.

MOURA, A.A. *et al.* A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, p. 169-188, 2007.

MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididimal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 74, p. 214–222, 2006.

MOURA, A.A. *et al.* Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 27, p. 201–211, 2006.

MOURA, A.A. *et al.* Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 139-144, 2011.

MOURA, A.A. *et al.* A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p. 98-169, 2007.

MUIÑO BLANCO, R. *et al.* Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 27-39, 2008.

MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 18–31, 2005.

NAGASE, H.;WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 21491-21494, 1999.

NASS, S.J. *et al.* Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 237-246, 1990.

O`FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

PLANTE, G.; THERIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of recombinant murine binder of sperm protein homolog 1 and its role in capacitation. **Biology of Reproduction,** v. 87, p. 1–11, 2012.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 56, p. 425-434, 2001.

PARRISH, J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, p. 67–73, 2014.

PAPA, F. O. *et al.* Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 293-301, 2008.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 60, p. 289-310, 2006.

PORATH, J. Sweden: molecular sieving and adsorption. **Nature**, v. 7, p. 218-834, 1968.

RÊGO, J.P.A. Análise Proteômica do Plasma Seminal de Carneiros Santa Inês Adultos. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

RIFFO, M. S.; PARRAGA, M. Study of the acrosome reaction and the fertilizing ability of hamster epididymal cauda spermatozoa treated with antibodies against phospholipase A2 and/or lysophosphatidylcholine. **Journal of Experimental Zoology**, Malden, v. 275, p. 459-468, 1996.

ROBINSON, L.L.L. *et al.* Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 641-648, 2001.

RODRÍGUEZ-VILLAMIL, P. *et al.* Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 85, p. 540-554, 2016.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. *et al*. Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal Reproductive Immunology**, v. 66, p. 11-22, 2011.

ROLDAN, E.R.S.; FRAGIO, C. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in Ca2+/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, p. 13962-13970, 1993.

ROLDAN, E.R; GOMENDIO, M. Sperm and conservation. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, Thrumpton, v. 217, p. 228-231, 2007.

SANTOS, J.R.S. *et al.* Respostas fisiológicas e gradientes térmicos de ovinos das Santa Inês, Morada Nova e de seus cruzamentos com a raça Dorper às condições do semiárido nordestino. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, p. 1-6, 2006.

SANZ, L. *et al*. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 37–43, 1993.

SCHÖNECH, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSPF: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology,** Amsterdam v. 45, p. 633-642, 1996.

SILVA, A.E.D.F. *et al*. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1890-1900, 2003.

SOLEILHAVOUPA, C. *et al.* Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics,** v. 109, p. 245–260, 2014.

SOUBEYRAND, S. *et al*. Purification of a novel phospholipase A2 from bovine seminal plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, p. 222- 227, 1997.

SOUZA, C.E.A. *et al.* Desenvolvimento testicular, idade à puberdade e características seminais em carneiros da raça Santa Inês no estado do Ceará. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2000, Viçosa.

SOUZA, C.E.A. *et al.* Reproductive development of santa inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animal**, Malden, v. 45, p. 644–653, 2010.

SPROTT, L.R. *et al.* Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **Journal of Animal Science,** v. 78, p. 795-798, 2000.

STRZEZEK, J. *et al.* Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science,** v. 29, p. 35–52, 1992.

THERIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1372–1379, 1995.

THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P.; LAFLEUR, M. Chemical and physical requirements for lipid extraction by bovine binder of sperm BSP1. **Biochimica et Biophysica acta,** v. 51, 2013.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipidbinding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction,** v. 61, p. 590-598, 1999.

THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 760-768, 1998.

THÉRIEN, I. *et al.* Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 71, p. 97-106, 2005.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, p. 1080-1088, 1997.

URNER, F.; SAKKAS, D. Review Protein phosphorylation inmammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 125, p. 17–26, 2003.

UPRETI, G.C. *et al*. Characterization of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. In: International Symposium on Spermatology. **Animal Reproductions Science**, Cairns, v. 9, p. 32, 1994.

UPRETI, G.C. *et al.* Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 56, p. 107-121, 1999.

VAN TILBURG, M.F. *et al.* Proteome of the rete testis fluid from tropically-adaptedMorada Nova rams. **Animal Reproduction Science**, Brazil, v. 176, p. 20–31, 2007.

VAN TILBURG, M.F. *et al.* Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (Capra hircus) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3 degrees S). **International Journal Biometeorology**, v. 59, 2015.

VAN TILBURG, M.F. *et al.* Estudo qualitativo da interação das BSPs (Binder of Sperm Proteins) com as células espermáticas em ruminantes. *In:* XXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2011, Cumbuco-CE. *In:* XXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2011, Belo Horizonte-MG.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 1, p. 39–50, 2003.

VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 59, p. 1-6, 1998.

WARD, W.S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 30–36, 2010.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, Cambridge, v. 3, p. 371-372, 1994.

ANEXO A - PROTOCOLO DO GEL DE ELETROFORESE 1D

- Gel de Separação (12,5%)

Solução A..... 4,17 mL
Solução B..... 2,5 mL
Água bidestilada..... 3,16 mL
Retirar o gás
PSA 10%..... 70 µL
TEMED..... 10 µL

- Gel de Concentração (4%)

Solução A..... 0,65 mL
Solução B..... 21,25 mL
Água bidestilada..... 3,05 mL
Retirar o gás
PSA 10%..... 35 µL
TEMED..... 10 µL

- Solução A

Acrilamida..... 29,2 g
Bisacrilamida..... 0,9 g
Água bidestilada q.s.p..... 100 mL

- Solução B

Tris..... 18,15 g
Água bidestilada q.s.p..... 100 mL
Ajustar o pH em 8,8

- Solução C

Tris..... 18,15 g
Água bidestilada q.s.p..... 100 mL
Ajustar o pH em 8,8

- SDS (10%)

Sódio duodecilsulfato (SDS)..... 10 g

Água bidestilada q.s.p..... 100 mL

Armazenar em temperatura ambiente

ANEXO B - SOLUÇÃO CORANTE PARA GEL 1D

- Corante Azul de Comassie

Azul de comassie R250..... 0,5 mL

Etanol..... 250 mL

Água bidestilada q.s.p..... 250 mL

ANEXO C - SOLUÇÃO DESCORANTE PARA GEL 1D

- Descorante

Etanol..... 375 mL

Água bidestilada q.s.p..... 625 mL