

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ- UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E
SAÚDE ANIMAL

Manoel Augusto Klempovus Villela Condessa

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOFÍSICA DA
PROTEÍNA ESPERMADESINA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA
RAÇA TEXEL

Umuarama
Dezembro-2016

Manoel Augusto Klemovus Villela Condessa

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOFÍSICA DA
PROTEÍNA ESPERMADESINA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA
RAÇA TEXEL**

Nível: Mestrado

Área de concentração: Produção Sustentável

Orientador: Antonio Campanha Martinez

Co-orientador: Flavio Augusto Vicente Seixas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do título de Mestre.

Umuarama-2016

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOFÍSICA DA
PROTEÍNA ESPERMADESINA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA
RAÇA TEXEL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Dissertação aprovada em: _____ / _____ / 2016

Prof. Dr. Nei Moreira (UFPR- Palotina)
(Membro)

Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira Júnior
(Membro)

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez
(Orientador)

RESUMO

A inseminação artificial é uma ferramenta importante para o desenvolvimento da pecuária, pois permite o uso de reprodutores selecionados, com características genéticas superiores. No entanto, para seu melhor aproveitamento na ovinocultura ainda são necessários muitos avanços, principalmente na identificação do papel das diversas proteínas que compoem o plasma seminal, na qualidade do sêmen refrigerado e criopreservado. Dentre essas proteínas destaca-se a família das espermedesinas, proteínas de baixo peso molecular, ligadas à superfície dos espermatozoides que representam as principais proteínas encontradas no plasma seminal de algumas espécies. Não há relatos na literatura descrevendo a estrutura e os efeitos desta proteína no plasma seminal ovino, portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever pela primeira vez as características estruturais e biofísicas desta proteína de ovinos da raça Texel. Para isto amostras de sêmen de dois carneiros foram coletadas, o plasma separado, e a espermedesina isolada por técnicas de cromatografia de troca iônica. A pureza da amostra foi checada por SDS-PAGE e depois utilizada em estudos de desnaturação térmica por dicroísmo circular (CD). Sua sequência de aminoácidos foi utilizada para modelar sua estrutura tridimensional, a qual foi comparada com os dados experimentais de CD e teve sua estabilidade estrutural avaliada por simulações de dinâmica molecular. Os resultados mostraram que a proteína possui temperatura de desenovelamento de 65,2 °C e ΔH_m de 344,9 kJ/mol, superior ao descrito na literatura, que atribuímos a presença de duas pontes de dissulfeto em sua estrutura, a qual é composta essencialmente por elementos estruturais de folha-beta, assim como nas demais estruturas de espermedesinas conhecidas. Estas informações permitem concluir que a espermedesina pode ter um papel importante na manutenção da viabilidade dos espermatozoides em ambientes com temperatura mais elevada em relação ao epidídimo, como por exemplo, no interior do trato genital feminino.

Palavras-chave: carneiro, espermatozoides, inseminação artificial, proteínas, reprodutores.

ABSTRACT

The artificial insemination is an important tool for the development of livestock, allowing the use of selected breeders with superior genetic characteristics. However, for its better use in sheep production, many advances are still necessary, such as the identification of the role of the several proteins present in the seminal plasma as well as its role in the quality of the refrigerated and cryopreserved semen. Among these proteins lies the family of spermadines, a group of proteins with low molecular weight that are attached to the surface of the spermatozoa representing the main proteins found in the seminal plasma of some species. There are no reports in the literature describing the structure and effects of this protein on sheep seminal plasma. Therefore, the objective of this study was to describe for the first time, the structural and biophysical characteristics of this protein in rams of Texel breed. To achieve this, semen samples from two rams were collected, the plasma separated and the spermadhesin isolated by ion exchange chromatography techniques. The purity of the sample was checked by SDS-PAGE and the protein then used for thermal denaturation studies by circular dichroism (CD). The amino acid sequence of ram spermadhesin was used to model its three-dimensional structure, which was compared to the experimental data from CD. The structural stability of this protein model was also evaluated by molecular dynamics simulations. The results indicate that the protein had a melting temperature of 65.2 °C and a ΔH_m of 344.9 kJ.mol⁻¹, higher than the temperature described in the literature. We attribute it to the presence of two disulfide bonds in protein structure, which consists essentially of beta-sheet secondary elements, the same pattern observed in other known structures of spermadhesins. Those informations allows us to conclude that ram spermadhesin may play an important role in maintaining the viability of spermatozoa in environments with a higher temperature regarding to the epididymis, such as inside the female genital tract.

Key words: artificial insemination, breeder, proteins, sheep, spermatozoa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação planar da luz não polarizada (A) representação planar da luz polarizada (B).	22
Figura 2 – Representação planar da luz circularmente polarizada.....	22
Figura 3 – Espectros de CD de estruturas α -hélice, folha- β e estruturas irregulares	23
Figura 4 – Esquema representando a utilização de uma estrutura molde para gerar o modelo 3D de uma proteína através do alinhamento de sequência de aminoácidos	25
Figura 5 – Exemplo do arranjo ordenado em um cristal de proteína. O retângulo preto representa a cela unitária, a unidade (arranjo) que se repete dentro do cristal. Fonte: Katona et al., 2003	28
Figura 6 – Diagrama da barreira energética à cristalização.	28
Figura 7 – Método de cristalização por difusão de vapor conhecido como gota pendurada (<i>hanging drop</i>).....	29
Figura 8 – Perfil de eluição cromatográfica do plasma seminal de ovinos da raça Texel, destacando o pico contendo a fração com a espermedesina.....	36
Figura 9 - Gel de SDS-PAGE mostrando as frações com a espermedesina isolada, a qual apresenta peso molecular de 14 KDa.....	37
Figura 10 - Variação do espectro de dicroísmo no UV em função do aquecimento. .	38
Figura 11 - Variação da elipicidade média em 210 e 210,5 nm em função da temperatura.....	38
Figura 12 - Variação do ΔG em função da temperatura (equação 7). A linha vermelha corresponde ao melhor ajuste da equação 8 aos pontos experimentais. ...	39
Figura 13 - Tela do programa CDNN mostrando a composição secundária da espermedesina ovina a partir do espectro de CD a 20 °C.....	40
Figura 14 - BlastP contra a base de dados PDB indicando a identidade e identificação da proteína molde.....	41
Figura 15 - Estrutura em fita representando o modelo gerado da espermedesina ovina. Destaca-se os elementos de estrutura secundária como folhas- β e as alças e voltas (elementos desordenados).	42
Figura 16 - Gráfico de Ramachandram mostrando a qualidade estereoquímica do modelo da espermedesina ovina e do seu molde cristalográfico.	43
Figura 17 - Gráfico de RMDS mostrando oscilação dos átomos da cadeia principal da espermedesina em função do tempo. A oscilação apresentada no gráfico é obtida	

comparando-se a distância de cada átomo em relação à posição do mesmo átomo na estrutura de referência (minimizada).....	44
Figura 18 - Gráfico mostrando a variação do raio de giro calculado para os átomos da cadeia principal da espermedesina em relação à estrutura inicial de referência (minimizada).....	45
Figura 19 – Gráfico RMSF mostrando a oscilação do C calculado para cada resíduo de aminoácido nos últimos cinco ns de simulação.....	46
Figura 20 – Foto mostrando a presença de microcristais de espermedesina ovina..	47
Figura 21 – Cladograma mostrando a relação filogenética entre as estruturas de espermedesina de suíno, touro e de carneiro.....	49
Figura 22 – Sobreposição das estruturas das espermedesinas de Carneiro (vermelho), Touro (cinza), Suíno PSP-I (azul escuro) e Suíno PSP-II (azul claro)...	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da porcentagem de elementos de estrutura secundária observados na proteína purificada a partir da espectroscopia de CD, com a porcentagem encontrada na estrutura modelada e a porcentagem observada na espermedesina recombinante de bode.	40
Tabela 2 – Comparação dos elementos de estrutura secundária das estruturas 3D das espermedesinas, por meio do servidor VADAR.	48

LISTA DE ABREVIações

μL	microlitro
atm	atmosfera
AQN-1/ AQN-3/ AWN	espermadesinas de suínos
aSFP	<i>acidic Seminal Fluid Protein</i>
BSFP	<i>Buck Seminal Fluid Protein</i>
BSP	<i>Binder of Sperm Proteins</i>
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
CD	(Circular Dichroism) Dicroísmo Circular
COMCAP	Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa
CUB	domínio proteico
DM	Dinâmica Molecular
HPS-7	espermadesina de garanhões
K	Kelvin
KDa	quilo Daltons
M	Mol
Mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
Na^+	Sódio
nm	nanômetros
ns	nanossegundo
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	potencial Hidrogeniônico
PSP	<i>Protein Structure Prediction</i>

PSP-I/ PSP-II	espermadesinas de suínos
RSP	<i>Ram seminal Protein</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPDH 1/ SPDH 2	espermadesinas de touro
T_m	temperatura de Melting
UV	ultra violeta

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Importância das proteínas no plasma seminal	14
1.2. Espermedesinas.....	18
1.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).....	21
1.3.1. Princípio da técnica de CD segundo Verli, (2014).	21
1.4. Princípio da técnica de modelagem molecular por homologia, segundo Verli (2014).....	24
1.5. Princípio da técnica de Dinâmica molecular segundo Verli (2014).....	25
1.6.. Princípio da técnica de cristalização da proteína.....	26
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivos gerais.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAL e MÉTODOS	31
3.1. Coleta de sêmen.....	31
3.2. Purificação da proteína	31
3.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).....	32
3.3.1. Avaliação dos parâmetros biofísicos da espermedesina.	32
3.3.2. Estimativa da composição de elementos de estrutura secundária.	34
3.4. Modelagem da estrutura 3D da espermedesina ovina.....	34
3.4.1. Modelagem da espermedesina ovina.....	34
3.5. Dinâmica molecular.....	35
3.5.1. Dinâmica molecular da espermedesina ovina	35
3.6. Cristalização da proteína.....	35
3.6.1. Cristalização da espermedesina ovina.	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Purificação da proteína.	36
4.2. Determinação dos parâmetros biofísicos por Dicroísmo Circular (CD).....	37
4.3. Modelagem por homologia da estrutura 3D da espermedesina.....	41
4.4. Dinâmica molecular da estrutura 3D da espermedesina ovina.	43
4.5. Cristalização da espermedesina ovina.	47
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS	53

8. ANEXOS	60
8.1. Soluções para purificação da proteína no cromatógrafo.....	60
8.1.1. Tampão “A”	60
8.1.2. Tampão “B”	60
8.2. Soluções para a eletroforese SDS – PAGE.....	61
8.2.1. Solução Gel de corrida	61
8.2.2. Solução do gel de empilhamento (4% Acrilamida).	61
8.2.3. Fórmulas da soluções utilizadas na eletroforese SDS- PAGE.	62
8.3. Fórmula para a coloração do gel, utilizando Nitrato de Prata.	64
8.4. Protocolo utilizado para a cristalização da espermedesina de carneiro Texel.	65
8.4.1. Tampão Acetato de Amônio 100 mM (solução estoque Tampão Acetato).....	65
8.4.2. Tampão Acetato de Amônio 50 mM (solução Tampão)	65
8.4.3 PEG 3.350 33% pH 6,5 em tampão acetato de Amônio 50 mM	66
8.5. Normas de publicação da revista ABMVZ	67
8.6. Artigo submetido.....	74

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre técnicas que visam melhorar a eficiência reprodutiva em ovinos é de fundamental importância, principalmente empregando a técnica de inseminação artificial com taxas mais expressivas, favorecendo o uso de reprodutores selecionados e com índices superiores de fertilidade, identificando proteínas que auxiliem na preservação espermática durante a técnica de criopreservação.

A inseminação artificial é uma técnica que permite o melhoramento e seleção dos rebanhos, utilizando sêmen de reprodutores geneticamente superiores, pois características zootécnicas e genéticas desejáveis e com sêmen de qualidade significa rápido retorno de investimento, principalmente com o uso da inseminação artificial, porém esta técnica na ovinocultura apresenta alguns entraves, pois o sêmen criopreservado de ovinos tem uma taxa de viabilidade espermática reduzida, devido as alterações bioquímicas que ocorrem nas estruturas celulares dos espermatozoides, decorrentes do processo de congelação e descongelação, afetando a fertilidade dos mesmos, pois espermatozoides de carneiros apresentam uma maior sensibilidade à criopreservação quando comparado aos de outras espécies de mamíferos, de tal modo as taxas de inseminação artificial são reduzidas, quando feito o uso de sêmen congelado (DOMÍNGUEZ et al., 2008; SILVA, 2014). Devido essa redução de desempenho dos espermatozoides e a conformações anatômicas do colo do útero da ovelha, a utilização de sêmen para a inseminação cervical é restrita ao sêmen fresco, de modo que o sêmen descongelado é utilizado exclusivamente para a inseminação intrauterina (DOMÍNGUEZ et al., 2008).

Entretanto, a utilização de sêmen congelado apresenta como principal vantagem a possibilidade de existir um distanciamento significativo de tempo entre o momento da colheita e da inseminação artificial, considerando que os espermatozoides ovinos submetidos ao processo de criopreservação apresentam alterações funcionais, impedindo assim a obtenção de índices de fertilidade satisfatórios, dificultando a plena difusão da técnica de inseminação artificial em ovinos (CÂMARA & GUERRA, 2011), técnica essa que permite maximizar o melhoramento genético, aumentando a progênie do macho em diversos lugares simultaneamente, além de possibilitar a manipulação e

armazenagem de material genético. O sêmen criopreservado permite um melhor aproveitamento dos reprodutores, quando comparado com o sêmen fresco que possui curto período de estocagem (MOURA et al., 2011). Desse modo, estudos com o intuito de melhorar a viabilidade do sêmen congelado em ovinos estão sendo realizados, principalmente na relação entre as concentrações de proteínas no plasma seminal como um fator protetor aos espermatozoides, sendo estas proteínas associadas com aspectos de potencial reprodutivo em várias espécies (SOUZA et al., 2012). E usadas como possíveis marcadores de capacidade reprodutiva nos machos (MOURA et al., 2011). Em um estudo avaliando a composição sazonal de proteínas no plasma seminal de carneiros e associando-as com os efeitos da congelação, Domínguez et al., (2008), concluíram que o plasma proveniente das estações de outono e inverno (estação reprodutiva dos ovinos), melhorou a motilidade dos espermatozoides submetidos ao processo de congelação e descongelação, mas que não houve alteração na concentração de proteínas e nem na capacidade de ligação das mesmas com a membrana dos espermatozoides em relação a temperatura de congelação utilizada (-18 e -196), indicando que as proteínas do plasma seminal que se ligam aos espermatozoides exercem funções responsáveis pela estabilização da membrana das células espermáticas, sendo necessários mais estudos para melhor compreender o papel desempenhado por tais proteínas.

Rêgo (2010), avaliando o proteoma realizado em carneiros da raça Santa Inês, identificou as proteínas mais abundantes no plasma, pertencendo às famílias das BSPs (*Binder of Sperm Proteins*) e as espermedesinas, sugerindo que em ovinos esses dois grupos de proteínas exerçam funções importantes relacionadas à fisiologia reprodutiva, como a capacitação espermática, formação do reservatório espermático no oviduto e na interação entre espermatozoide e oócito.

1.1. Importância das proteínas no plasma seminal

O ejaculado é composto por espermatozoides e o plasma seminal, uma mistura complexa rica em elementos orgânicos e inorgânicos, produzida pelos testículos, epidídimos e glândulas anexas, a sua composição em relação às proteínas varia entre as espécies e também entre os indivíduos, sendo esses

componentes importantes na manutenção e viabilidade espermática (HAASE et al., 2005; CARDOZO et al., 2006; CABALLERO et al., 2008; CAJAZEIRAS, 2009). O plasma seminal possui fatores que influenciam tanto o espermatozoide quanto o trato genital feminino durante o transporte espermático, sendo muitos desses fatores as proteínas (CABALLERO et al., 2008). Desse modo, por ser tão complexo, é um composto promissor para o estudo e identificação de potenciais biomarcadores relacionados a fatores reprodutivos, como exemplo a fertilidade dos machos (GONZÁLEZ-CADAVID et al., 2014).

Proteínas são componentes do plasma seminal que influenciam na fertilidade e funções espermáticas, sendo estas divididas em três principais famílias nos animais ungulados: proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs), proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II (fn II) e proteínas da família das espermadesinas (BERGERON et al., 2005; CAJAZEIRAS, 2009; TREIN, 2014).

Informações sobre os efeitos dos componentes do plasma seminal são necessárias para melhorar a longevidade e qualidade do sêmen ovino criopreservado (MOHAMMAD et al., 2015). Considerando características importantes na qualidade espermática, como motilidade, integridade da membrana plasmática e integridade do acrossoma pós descongelção. Técnicas mais avançadas de avaliação de sêmen ovino, ainda que estejam restritas a centros de pesquisas devido à dificuldade encontrada para a realização necessitam de avanços, pois tais técnicas permitem aumentar a acurácia e repetibilidade das análises (BERGSTEIN, et al., 2014).

Soleilhavoup et al., (2014) identificaram mais de 700 proteínas presentes no plasma seminal de carneiros, Souza et al., (2012) identificaram 41, Goularte et al., (2014) identificaram 6 bandas proteicas consideradas candidatas como marcadores de tolerância espermática para congelação, sendo que várias destas podem futuramente ser usadas como biomarcadores de funções específicas no sêmen, ajudando a entender melhor o papel do plasma seminal na fertilidade masculina, Rickard et al., 2015 identificaram marcadores de resistência a congelação. Proteínas do plasma tem sido relatadas para proteger os espermatozoides de carneiros aos danos causados pelo choque térmico da criopreservação, alguns autores sugerem que as espermadesinas

são responsáveis por manter estas propriedades protetoras (SOLEILHAVOUP et al., 2014). Estudos demonstram a importância do plasma seminal auxiliando positivamente na fertilidade, servindo também como diluente e veículo para os espermatozoides e exercendo ação estimulante na motilidade espermática durante a ejaculação. Segundo esses autores é provável que várias proteínas do plasma seminal possuem funções moduladoras, incluindo capacitação espermática, reação acrossômica e interação espermatozoide-oócito, entre outras (MOURA et al., 2011; SOUZA et al., 2012; SOLEILHAVOUP et al., 2014; LUNA et al., 2015). Em um estudo realizado para determinar biomarcadores em dromedários, Waheed, et al., (2015) utilizaram 8 dromedários férteis e 11 inférteis, e concluíram que CRISP3, sPLA2, GPx e testosterona são biomarcadores associados a fertilidade, presentes tanto no plasma como no soro. E que a osteopontina do plasma seminal é positivamente correlacionada com a fertilidade, e que a prostaglandina D sintetase está negativamente associada à fertilidade em dromedários. Um estudo realizado com 56 touros da raça Brahman, Rêgo et al., (2014) analisaram os atributos bioquímicos das proteínas identificadas e concluíram que estas podem participar na maturação, proteção, capacitação espermática, sobrevivência no oviduto, reação acrossômica e na fertilização. Demonstrando assim a necessidade de novas pesquisas para o conhecimento fisiológico de tais proteínas.

A composição de proteínas de preservação varia entre os machos. Alguns animais apresentam maior sensibilidade à criopreservação, sendo estes classificados em animais de alta e baixa congelabilidade. Carneiros com baixa congelabilidade apresentam maiores quantidades de proteínas prejudiciais aos espermatozoides e, conseqüentemente, carneiros com alta congelabilidade apresentam maiores quantidades de proteínas protetoras (SOLEILHAVOUP et al., 2014). O conhecimento do perfil proteico do plasma seminal possibilita a utilização de proteínas como marcadores moleculares, para que tanto a ausência ou presença destas proteínas possa ser atribuída a uma melhor qualidade seminal, futuramente tornando-se uma ferramenta para auxiliar na seleção de reprodutores (NASCIMENTO et al., 2012). A expectativa de dispor desses marcadores que contribuam para a avaliação do desempenho do animal tem sido objetivo de várias pesquisas nas últimas décadas, possivelmente contribuindo significativamente na seleção de reprodutores

(JOBIM et al., 2009). Silva e Guerra (2014) ressaltam a necessidade de realizar pesquisas com intuito de identificar crioprotetores, em quais concentrações e quais momentos estes devem ser adicionados aos diluentes, objetivando melhores índices de integridade espermática pós criopreservação. Nos últimos anos houve um considerável aumento no interesse em desenvolver biotecnologias reprodutivas, principalmente as que estão envolvidas no processo de criopreservação dos espermatozoides, pois tal técnica promove injúrias aos mesmos, o que diminui as taxas de fertilização, e conseqüentemente diminui os lucros na produção. Dessa forma, Caballero et al., (2008), concluíram que o uso de espermadesinas isoladas na espécie suína (PSP-I/PSP-II), podem contribuir para o desenvolvimento de novas biotecnologias reprodutivas, entretanto são necessários novos estudos para melhor compreender as funções das espermadesinas na capacitação espermática e sua utilização em sêmen congelado. Rêgo (2010) resalta a importância do estudo de proteínas presentes no plasma seminal para a elaboração de novas ferramentas ligadas a biotecnologia da reprodução e através disso desenvolver estratégias para a seleção de carneiros baseado em parâmetros do plasma, possibilitando identificar fertilidade e precocidade sexual. Estudos com uma grande população de animais são necessários para validar a presença de biomarcadores, utilizando isso como método de seleção de reprodutores baseados no perfil proteico do plasma seminal (BOE-HANSEN et al., 2015).

De acordo com Câmara & Guerra (2011) é necessário a realização de estudos que objetivem o prolongamento da capacidade dos gametas, pois muitas vezes as diferenças de fertilidade observadas nos animais não são detectadas através de testes rotineiros aplicados na avaliação da qualidade do sêmen, podendo tais diferenças serem atribuídas aos componentes moleculares presentes nos espermatozoides e no plasma seminal (JOBIM et al., 2009; MOURA et al., 2011). Análises bioquímicas associadas aos critérios de avaliação espermática, poderiam ser auxiliares na identificação de importantes diferenças entre o potencial de fertilidade dos animais (JOBIM et al., 2009). Sendo os resultados envolvendo índices de fertilidade “in vitro” mais significativos para indicar as proteínas candidatas a marcadores (JOBIM et al., 2009). Adicionando sêmen de carneiro com alta congelabilidade em sêmen de

carneiro com baixa congelabilidade antes da criopreservação, Silva, (2014) observou que esta adição incrementou a qualidade do sêmen, considerando que alguns animais apresentam maior sensibilidade a criopreservação. Identificando bandas proteicas, Goularte et al., (2014) avaliaram a motilidade espermática e integridade da membrana plasmática antes e depois da descongelação e a integridade do acrossoma pós descongelação, concluindo que a presença em maiores quantidades de determinadas bandas e menores em outras favoreceram a uma melhor motilidade e integridade da membrana plasmática e integridade do acrossoma.

1.2. Espermedesinas

Espermedesinas são proteínas de baixo peso molecular (12 a 16 KDa) secretadas pelo trato genital masculino e glândulas anexas, ligadas à superfície dos espermatozoides e representam as principais proteínas encontradas no plasma seminal de algumas espécies, possuindo um domínio CUB em sua estrutura (ROMERO et al., 1997), sigla originária das primeiras proteínas identificadas com este domínio (BORK & BECKMAN, 1993): C de subcomponentes do complemento (Clr, Cls) U da proteína do embrião do ouriço-do-mar (Uegf) e B da proteína 1 morfogenética do osso (Bmp1), o que pode ser atribuído as suas funções (CALVETE et al., 1995; VARELA et al., 1997; ROMÃO et al., 1997; HAASE et al., 2005; CABALLERO et al., 2008), sendo este estabilizado por meio de duas pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteínas vizinhas, onde os conhecimentos sobre o domínio CUB de dois membros da família espermedesina inicialmente foram revelados através da estrutura cristalina (CALVETE, et al., 1995). Estudos procuram identificar a origem celular das espermedesinas, em suínos a vesícula seminal tem sido indicada como a principal fonte produtora, embora ocorra também síntese proteica nos epidídimos e outras glândulas anexas do aparelho reprodutor de suínos (DOSTÁLOVÀ, et al., 1994; TOPFER-PETERSEN, et al., 2008).

A função e a estrutura da espermedesina têm sido estudadas em suínos. Estas proteínas são as mais abundantes no plasma dessa espécie, representando em torno de 90% (TOPFER-PETERSEN, et al., 1998; HAASE, et al., 2005; CABALLERO, et al., 2008), sendo em garanhões também as

principais proteínas, já em bovinos as principais proteínas do plasma são pertencentes à família das fibronectinas que contém o domínio tipo II (BERGERON, et al., 2005). Em um estudo realizado com sêmen coletado de 12 cachacos, para a identificação das proteínas presentes e correlacioná-las aos parâmetros espermáticos, González-Cadavid et al., (2014), identificaram que a maioria das proteínas presentes no plasma de cachacos são pertencentes à família das espermadesinas (45,2%), utilizando o 2D-SDS-PAGE como método, ressaltando que existem diferenças nos teores de proteínas de acordo com o método utilizado para a identificação (cromatografia). Na espécie bovina, mais especificamente na raça Brahman (*Bos indicus*), Rêgo et al., (2014), identificaram 46 proteínas, sendo as principais as BSP (*Binder of Sperm Proteins*) 1, 3 e 5, correspondendo a 55,8% do total identificado, semelhante ao que já foi descrito em animais *Bos taurus*, tais proteínas desempenham funções associadas aos mecanismos espermáticos, interagindo com outras proteínas (apolipoproteína A1, espermadesina e proteína secretada pelo epidídimo E1), entre outros componentes ligados às funções espermáticas. As espermadesinas-1 e Z13 foram as segundas em maior quantidade.

As espermadesinas são consideradas pertencentes a uma classe de lectinas animais, sendo assim proteínas multifuncionais com capacidade de se ligar a carboidratos, inibidores de proteases e fosfolipídios, sugerindo funções em várias etapas da fertilização, entre elas a capacitação espermática (DOSTÀLOVÀ et al., 1994; VARELA et al., 1997; TOPFER-PETERSEN et al., 1998; HAASE et al., 2005; CABALLERO et al., 2008), já identificadas em suínos, bovinos, equinos, caprinos e ovinos.

Ainda está sendo estudado o papel fisiológico dessas proteínas, autores acreditam que ela possa estar ligada ao processo de capacitação espermática, reconhecimento e ligação entre os gametas (DOSTÀLOVÀ et al., 1994; VARELA et al., 1997; TOPFER-PETERSEN et al., 1998). Em suínos possui importância na viabilidade e motilidade espermática (CABALLERO et al., 2008).

As proteínas da família das espermadesinas já foram identificadas e relatadas em várias espécies de mamíferos. Em suínos, 5 espermadesinas foram identificadas, AQN-1, AQN-3, AWN, (heterodímeros), PSP-I, e PSP-II divididas em duas classes, de acordo com suas capacidades de ligação a

heparina, onde as AQN-1, AQN-3, AWN apresentam ligação com heparina e receberam essa nomenclatura baseada nos três primeiros resíduos de aminoácidos das suas sequências: alanina (A), glutamina (G), asparagina (N) e triptofano (W), e pertencentes a segunda classe estão as PSP-I, e PSP-II sem ligação a heparina (VARELA, et al., 1995), em bovinos duas espermedesinas foram identificadas, a SPDH 1 (aSFP) (WENPE et al., 1992) e a SPDH 2 (Z13) (TEDESCHI et al., 2000), em garanhões uma espermedesina homóloga a de caprinos foi identificada, a HPS-7 (REINERT et al., 1996), em caprinos as BSFP (*Buck Seminal Fluid Protein*) foram identificadas pertencentes a essa família (TEIXEIRA et al., 2002; MELO et al., 2008). Bergeron et al., (2005) isolaram as principais proteínas presentes no plasma seminal de carneiros, por meio da cromatografia de afinidade em coluna com gel de agarose, indicando que as espermedesinas (RSP) e as proteínas da família das BSP provavelmente desempenham funções biológicas semelhantes, e as espermedesinas representaram as principais proteínas do plasma de carneiros, 45% do total.

O baixo volume de plasma seminal de algumas espécies (ovino, caprino), dificulta a obtenção de espermedesinas para a realização de estudos nas áreas de Bioquímica, Reprodução e biotecnologias aplicadas a reprodução animal, devido esse entrave, Cajazeira et al., (2009) encontraram a necessidade em produzir proteínas recombinantes, tornando a produção de espermedesinas em larga escala, através da utilização de bactérias como fonte de produção dessas recombinantes.

Caballero et al., (2008), verificaram um significativo aumento no percentual de espermatozoides viáveis quando adicionada as proteínas PSP-I/PSP-II em solução contendo espermatozoides suínos. Da mesma maneira que perceberam um número maior de células espermáticas mortas quando estas foram incubadas na ausência das PSP-I/PSP-II, de tal modo podendo essas proteínas futuramente serem utilizadas como ferramentas no desenvolvimento de biotecnologias envolvidas na preservação de espermatozoides.

1.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).

1.3.1. Princípio da técnica de CD segundo Verli, (2014).

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica utilizada para estudar uma grande variedade de moléculas quirais (molécula que não é sobreponível à sua imagem no espelho).

A espectroscopia é um levantamento de dados físico-químicos de um determinado sistema através da transmissão, absorção ou reflexão da energia radiante incidente. No caso do CD, a energia incidente é a ultravioleta comumente na faixa do UV, 380 a 180 nm. Desse modo o espectro de CD é gerado pela diferença da capacidade de absorção dos componentes esquerdo e direito da luz circularmente polarizada por moléculas quirais que possuem átomos de carbono assimétricos e, conseqüentemente, diferentes atividades ópticas.

A capacidade de absorção de moléculas quirais está diretamente ligada às diferenças nos seus coeficientes de absorbância. De tal modo, diferentes moléculas ou partes delas possuem CD em regiões específicas do espectro. Em instrumentos de laboratório, espectros de CD são normalmente registrados no UV, tipicamente em comprimentos de onda variando de 180 a 260 nm.

De um modo geral, os espectros de CD são utilizados para diversos tipos de estudos, incluindo: enovelamento e estrutura secundária de proteínas, estrutura de proteína de membrana inseridas em bicamadas lipídicas, interação entre moléculas, monitoramento de integridade de moléculas sob aquecimento, quantificação de alterações conformacionais, caracterização de domínios de proteínas, podendo ser empregado em comparações com modelos gerados computacionalmente.

O conceito de luz polarizada é importante para a realização de estudos de CD. A luz solar (luz convencional) é um exemplo de luz não polarizada (Figura 1 A), já que ela emite radiação que se propaga em todos os planos. Isso porque a luz branca é composta por ondas eletromagnéticas que vibram em diversos planos perpendiculares à direção da propagação da luz, já a luz polarizada é aquela que possui vibração em apenas um plano (Figura 1 B).

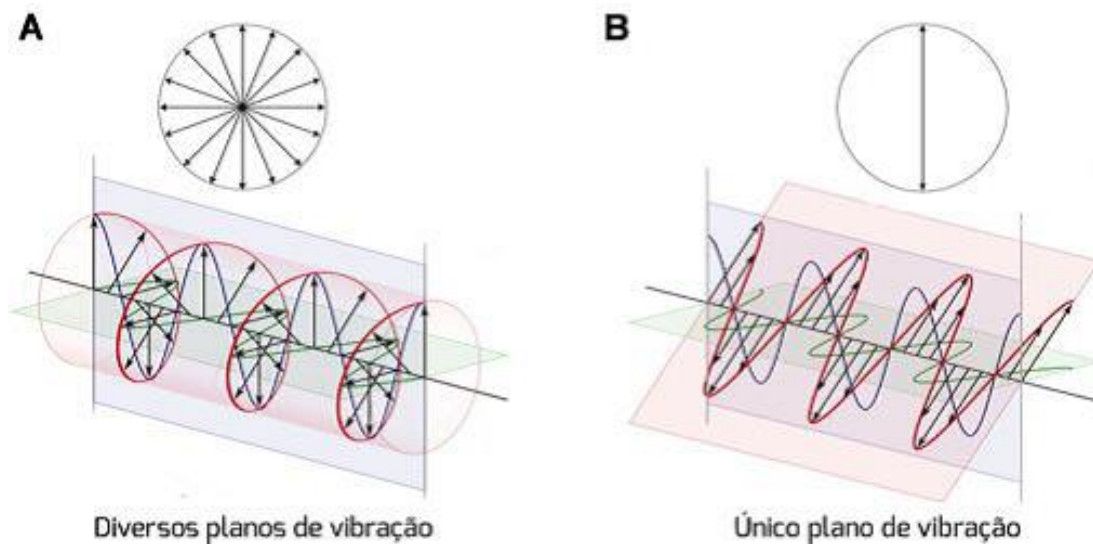


Figura 1. Representação planar da luz não polarizada (A) e polarizada (B).

No CD, a luz utilizada é circularmente polarizada, o que é uma combinação de duas ondas linearmente polarizadas, uma vertical e outra horizontal, de mesma amplitude.

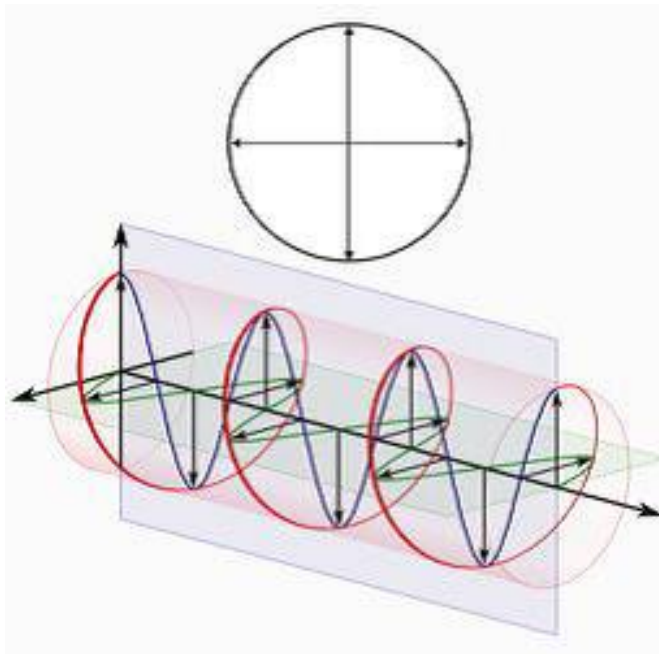


Figura 2 – Representação planar da luz circularmente polarizada.

A diferença de absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda dá origem ao espectro de CD. Desse modo, $CD = A_D - A_E$, onde A_D representa a absorção da luz circularmente polarizada à direita e A_E a absorção da luz circularmente polarizada à esquerda.

São os ângulos específicos Φ e Ψ da cadeia polipeptídica, os responsáveis por cada uma das estruturas secundárias conhecidas de proteínas. Cada tipo de estrutura secundária apresenta um espectro de CD característico, com bandas posicionadas em comprimentos de ondas específicos e distintos uns dos outros. Desse modo a forma do espectro de CD de uma proteína dependerá de seu conteúdo de estrutura secundária (Figura 3).

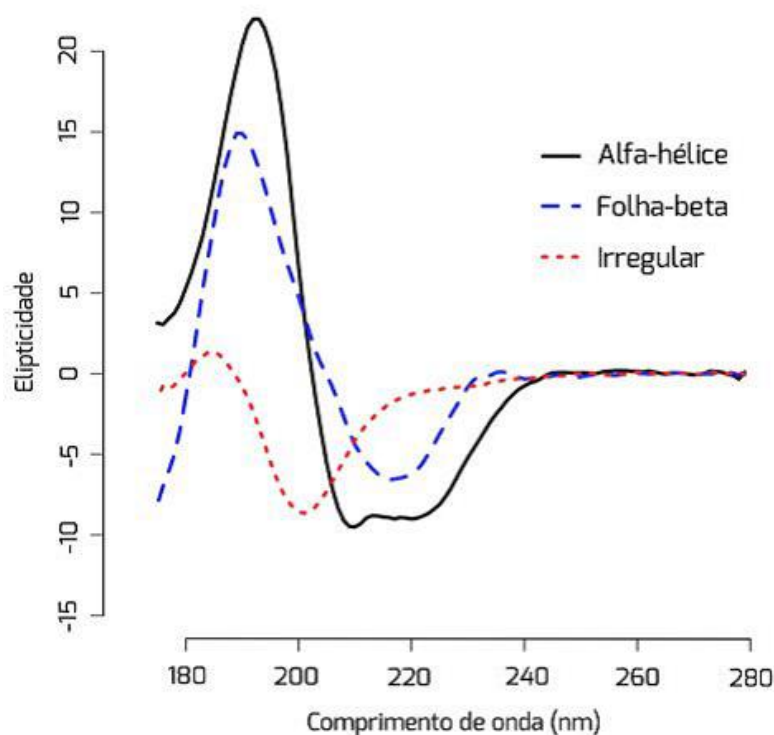


Figura 3 – Espectros de CD de estruturas α -hélice, folha- β e estruturas irregulares.

Deste modo, a partir de variações no espectro de CD, é possível acompanhar o fenômeno de mudanças conformacionais em proteínas decorrentes de sua interação com ligantes, bem como seu desenovelamento por ação de agentes desnaturantes e agentes físicos como, por exemplo, o aumento da temperatura.

1.4. Princípio da técnica de modelagem molecular por homologia, segundo Verli (2014).

A função de uma proteína está associada a sua estrutura tridimensional, isso inspira as buscas por um método que seja capaz de prever a estrutura nativa de uma proteína a partir da sua sequência de aminoácidos.

No método de modelagem por homologia, a proteína de interesse (alvo) terá sua estrutura 3D predita usando como referência a estrutura 3D de outra proteína similar (chamada também de molde). Essa proteína similar tem de possuir estrutura 3D resolvida experimentalmente, e as coordenadas cartesianas de seus átomos devem estar depositadas em banco de dados de estruturas como o PDB.

A modelagem por homologia é o método mais frequentemente empregado na determinação de estruturas e, seu limite de predição está intrinsecamente relacionado com o grau de similaridade entre estruturas alvo e molde. Geralmente, consideram-se como limites mínimos de aplicabilidade do método, valores de 25 a 30% de identidade, obtidos através do alinhamento entre a sequência de aminoácidos e de uma ou mais proteínas molde. A modelagem pode ser dividida em cinco etapas.

A primeira etapa é a identificação de referência, que tem por objetivo identificar sequências de aminoácidos de proteínas resolvidas experimentalmente que possuam similaridade com a sequência da proteína de interesse, cujas estruturas serão empregadas posteriormente como moldes. A próxima etapa consiste na seleção dos moldes, é necessário escolher uma ou mais estruturas que servirão de molde para a construção do modelo 3D final.

Uma vez escolhida a estrutura molde, é necessário realizar o alinhamento entre as sequências alvo e molde de forma a garantir que toda a proteína de interesse seja modelada. Alinhamento com mais de 40% de identidade é o suficiente para gerar um modelo confiável. O modelo final será uma representação desse alinhamento gerado.

A partir do alinhamento global entre as sequências alvo e molde, algoritmos específicos para PSP via modelagem comparativa irão transferir as informações extraídas da estrutura 3D da proteína molde para o modelo.

A última etapa consiste na validação do modelo onde, após a construção do modelo é necessário identificar possíveis erros relacionados aos métodos

empregados, à escolha das referências e ao alinhamento entre as sequências alvo e molde. Caso o modelo seja caracterizado como de má qualidade, todo o protocolo anterior deve ser revisto no intuito de se melhorar o alinhamento, escolher outros moldes ou até mesmo decidir-se pelo uso de outros métodos.

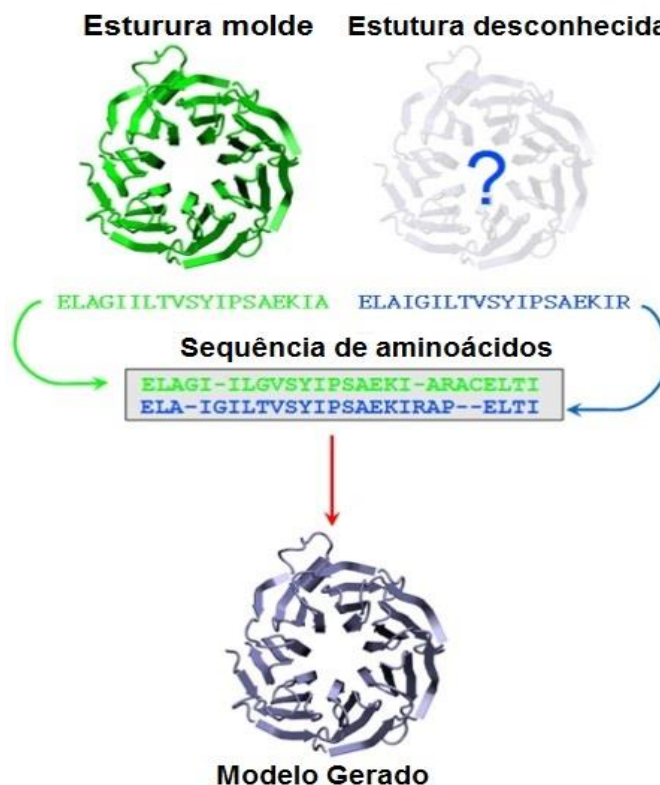


Figura 4. Esquema representando a utilização de uma estrutura molde para gerar o modelo 3D de uma proteína através do alinhamento da sequência de aminoácidos.

1.5. Princípio da técnica de Dinâmica molecular segundo Verli (2014).

Dinâmica molecular (DM) é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos de uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas de sólidos, líquidos e gases de acordo com as leis de movimento de Newton. Deste modo, a DM descreve a variação do comportamento molecular (movimento) como função do tempo.

A Dinâmica Molecular é uma das técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas. A metodologia da DM é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema. Para se obter as propriedades

macroscópicas de interesse, a aplicação da mecânica estatística é requerida, a qual tem a função de calcular propriedades observáveis macroscópicas como pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia, energia livre, a partir de outras variáveis microscópicas. Com base na Mecânica Molecular, as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas (forças de movimento), ou seja, são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas (restrições ao movimento descritas no campo de força). Um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas é referido como “campo de força”. O campo de força empírico, tal como é conhecido como uma função energia potencial permite que a energia potencial total do sistema, $V_{(r)}$, seja calculada a partir da estrutura tridimensional das moléculas. $V_{(r)}$ é descrito como a soma de vários termos de energia, que compõe a estrutura da molécula, que incluem: os termos para os átomos ligados como: o comprimento das ligações entre os átomos (V_e), os ângulos das ligações entre os átomos (V_b), os ângulos diedros (V_{tor-1} e V_{tor-p}), bem como os termos para átomos não ligados: interações de Coulomb (V_{elec}) e de van der Waals (V_{vdw}), conforme equação 1:

$$V_{(r)} = V_e + V_b + V_{tor-1} + V_{tor-p} + V_{elec} + V_{vdw} \quad (1)$$

Em resumo, a DM aplica movimento aos átomos do sistema (molécula), porém, estes átomos não podem se mover de qualquer maneira, eles devem obedecer a algumas restrições constantes no campo de força. Desta forma, o programa de simulação, utiliza dos termos do campo de força para calcular a energia do sistema. Se durante a simulação os termos convergirem para um valor ideal, a energia do sistema ($V_{(r)}$) tende a diminuir. Se os termos convergirem para valores distantes dos ideais, a energia do sistema tende a aumentar.

1.6.. Princípio da técnica de cristalização da proteína.

A difração de raios-X é um dos métodos mais utilizados para se conhecer completamente e com exatidão a estrutura molecular de uma

proteína, para isso é necessário a obtenção de cristais de proteína para a realização do experimento de difração de raios-X.

Um cristal é um sólido formado por átomos e íons ordenados em um mesmo padrão que se repete ao longo de uma rede regular. Os cristais são necessários nesta técnica, pois a difração de raios-X a partir de uma única molécula é muito difícil de mensurar. Desta forma, o cristal age como um amplificador, aumentando o sinal de difração uma vez que ele possui um conjunto de moléculas ordenadas de forma similar. A determinação de estruturas precisas requer cristais bem ordenados que difratem raios-X fortemente (BABINE & ABDEL-MEGUID, 2004).

A cristalização nada mais é do que forçar uma proteína a precipitar em um arranjo tridimensional ordenado. Este arranjo tridimensional sólido é o cristal. Para se chegar a uma forma cristalina a partir de proteína dissolvida em solução, é necessário que a solubilidade da molécula seja reduzida. Como regra geral, a redução da solubilidade de uma proteína em solução, resultará na formação de um precipitado de proteína amorfa. No entanto, se as condições apropriadas forem estabelecidas de modo que a superfície das moléculas de proteínas adjacentes em solução se alinhe de forma complementar, podem ocorrer interações de atração específicas entre tais moléculas. Se estas interações também forem geometricamente favoráveis, poderá levar a proteína a cristalizar (SHERWOOD & COOPER, 2011) (Figura 5).

Embora um cristal de proteína seja considerado sólido, ele é formado por uma grande quantidade de solvente, em torno de 30 a 50% e, quanto maior o teor de solvente, mais frágil é o cristal. Isso porque a estrutura cristalina é mantida por interações fracas como contatos de Van-der-Waals (interação hidrofóbica) e pontes de hidrogênio (LATTMAN & LOLL, 2008).

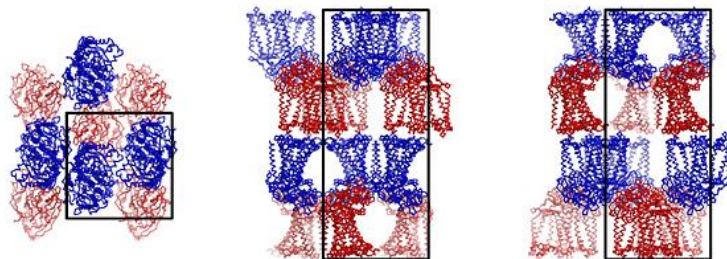


Figura 5. Exemplo do arranjo ordenado em um cristal de proteína. O retângulo preto representa a cela unitária, a unidade (arranjo) que se repete dentro do cristal. Fonte: Katona et al, 2003.

Existe uma barreira de energia para a cristalização que deve ser cruzada pelas proteínas antes que elas possam cristalizar, conforme mostra a Figura 6. O núcleo crítico corresponde a um intermediário de alta energia e, quanto mais alta for a barreira de energia, mais lenta será a taxa de nucleação.

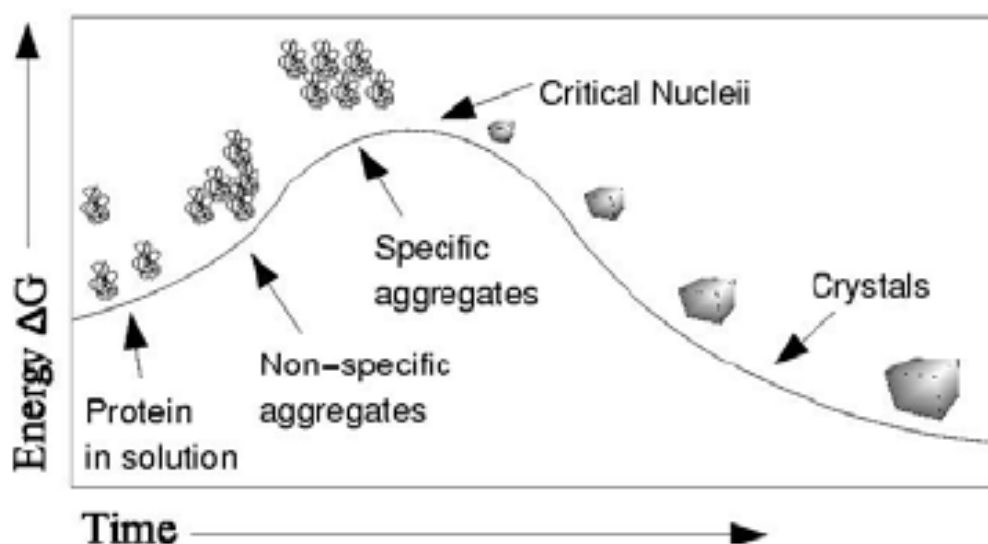


Figura 6. Diagrama da barreira energética a cristalização. (fonte: molecularsciences.org)

Existem vários métodos para se obter um cristal de proteína. O método utilizado neste projeto foi a difusão de vapor. Neste método, poucos microlitros da solução de proteína são misturados com um volume semelhante da solução de precipitante contida no reservatório. Uma gota desta mistura é colocada sob uma lamínula de vidro siliconizada que cobre o reservatório. Uma vez que a mistura proteína/precipitante (gota) é menos concentrada do que a solução do reservatório, a água lentamente evapora da gota até o reservatório (Figura 7).

Como resultado, a concentração de ambas: proteína e precipitante aumentam gradualmente na gota, levando os cristais a se formarem (DRENTH & MESTERS, 2007).

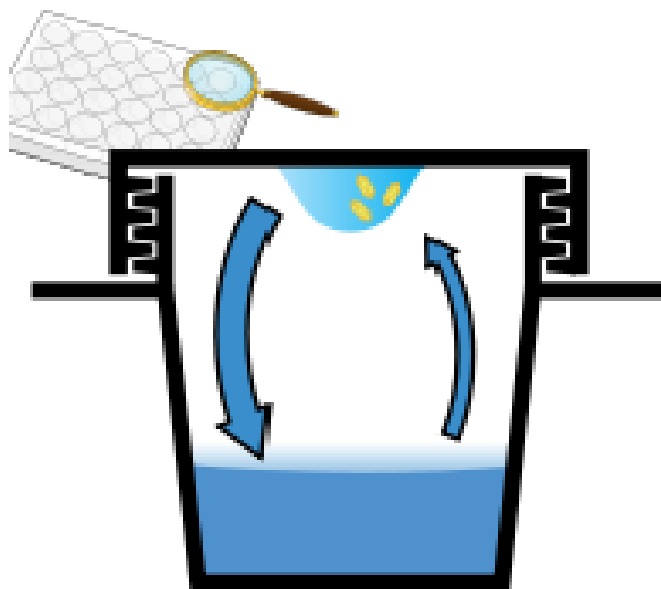


Figura 7. Método de cristalização por difusão de vapor conhecido como gota pendurada (hanging drop). Fonte: molecularsciences.org

Desta forma, foram realizados experimentos de cristalização da espermedesina purificada, o qual é uma etapa importante para se obter a estrutura da proteína por meio de experimentos de difração de raios-X.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivos gerais*

Purificar a proteína espermedesina presente no plasma seminal de carneiros da raça Texel.

Avaliar as características termodinâmicas desta proteína por meio de estudo de desnaturação com espectropolarímetro de dicroísmo circular (CD).

Modelar a estrutura tridimensional da proteína espermedesina e compará-la com os dados obtidos com o experimento de dicroísmo circular.

2.2. *Objetivos específicos*

Coletar o esperma ovino e separar o plasma seminal por meio de centrifugação.

Purificar a enzima do plasma seminal utilizando técnicas de cromatografia em coluna.

Avaliar a pureza da amostra por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Realizar estudos de desnaturação da espermedesina em espectropolarímetro de dicroísmo circular, de modo a determinar os parâmetros termodinâmicos ΔC_p , $\Delta H_{desnaturação}$ e $T_{melting}$ comparando estes parâmetros com os de espermedesinas de outras espécies de mamíferos. Usar os espectros de CD para estimar a composição da estrutura secundária da proteína em solução.

Determinar a estrutura tridimensional da espermedesina de ovinos por meio de modelagem por homologia e correlacionar a composição de sua estrutura secundária com os dados de CD.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Coleta de sêmen

O sêmen utilizado nas pesquisas foi proveniente de dois carneiros adultos da raça Texel, animais pertencentes a Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, campus de Umuarama, setor de Criação e Reprodução animal.

Para a coleta de sêmen foi realizada a técnica de eletroejaculação, que consiste no uso de um eletroejaculador, um eletrodo cilíndrico introduzido via retal que libera estímulos elétricos, proporcionando a ejaculação do animal. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi centrifugado a 4500 giros durante 15 minutos, para promover a separação do plasma seminal. Depois de separado o plasma foi armazenado em tubos criogênicos a -20° C, para que não ocorra perda das propriedades de interesse.

3.2. Purificação da proteína

As sequências dos experimentos descritas a seguir foram realizadas no laboratório de Bioquímica Estrutural da Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, campus de Umuarama. A purificação da proteína foi obtida por meio da técnica cromatografia de troca-iônica, utilizando um cromatógrafo AKTA Pure M20 (GE Lifesciences), acoplado a uma coluna HiTrap Q HP (GE Lifesciences) com volume de 1 mL.

Foram aplicadas no cromatógrafo 1,5 mL de uma solução de plasma seminal a 7% dissolvida em tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) e eluída com tampão B (Tris-HCl 20 mM + NaCl 1,0M, pH 8,0). Alíquotas de 2 mL foram coletadas com um coletor automático de frações e, a amostra foi identificada por meio de eletroforese SDS-PAGE a 15% corada com Nitrato de Prata (LAEMMLI, 1970).

Quando necessário, a amostra eluída foi concentrada com concentradores Amicon 10 Kd e passada em uma coluna de filtração em gel contendo resina Sepharose S300 (GE Lifesciences) equilibrada com tampão A, num fluxo de 1,0 mL por minuto.

3.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).

3.3.1. Avaliação dos parâmetros biofísicos da espermedesina.

Com a proteína isolada, foi efetuado o estudo estrutural com uso do equipamento de dicroísmo circular, disponível no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá, campus de Maringá. O dicroísmo circular (CD) é particularmente útil para o estudo de estruturas que possuem unidades opticamente ativas, ou seja, podem exibir sinal na espectroscopia de dicroísmo circular, permitindo a detecção de mudanças conformacionais da proteína previamente isolada, a qual será submetida a aquecimento contínuo como forma de provocar sua desnaturação gradual.

Para isso, uma solução de 400 μL de espermedesina purificada (1mg.mL^{-1}) foi adicionada em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm e acoplada em um espectropolarímetro de dicroísmo circular (CD) modelo Jasco J815. Foram coletados espectros de CD e de Absorbância entre os comprimentos de onda 190 a 300 nm. Cada espectro foi coletado em uma temperatura distinta entre 20 °C e 90 °C em intervalos de 5 °C. A variação espectral média em 210 e 210,5 nm foi utilizada para acompanhar a variação do espectro de absorção em função do aquecimento, de modo a determinar a temperatura de melting (T_m). A transição entre os estados Nativo e Desnaturado foi utilizada para se determinar a constante de desnaturação (K).



A fração de proteína total na solução é a soma da fração de proteína no estado Nativo mais a fração de proteína no estado desnaturado:

$$[\text{Pr}t] = [N] + [D] \quad (3)$$

A fração de proteína no estado nativo é igual a fração de proteína no estado desnaturado menos um:

$$f_N = [N]/[\text{Pr}t] = (1 - f_D) \quad (4)$$

A fração de proteína no estado desnaturado é igual a fração de proteína no estado nativo sobre a concentração total de proteína:

$$f_D = [D]/[Pr_t] \quad (5)$$

Combinando a equação 1, 2, 3 e 4, temos que o valor de K é igual a fração da quantidade de proteína no estado desnaturado sobre a quantidade de proteína no estado nativo:

$$K = \frac{[D]}{[N]} = \frac{f_D}{f_N} \quad (6)$$

Deste modo, é possível encontrar o valor de K para cada etapa da transição do estado nativo para o desnaturado, durante o experimento de desnaturação. Com o valor de K, é possível calcular o ΔG de desnaturação para cada etapa da transição durante o experimento de desnaturação:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (7)$$

Quanto a f_D for igual a f_N (no equilíbrio), ou seja, 50% da proteína no estado Nativo e 50% da proteína no estado Desnaturado, o valor de $\Delta G=0$.

Deste modo, para cada etapa do processo de desnaturação, é possível calcular o ΔG . O valor do ΔG pode então ser utilizado para se determinar a variação na Entalpia de desnaturação (ΔH_m) e a variação na Capacidade Calorífica (ΔC_p) a partir da equação 8.

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (8)$$

onde,

T_m = valor de T para $\Delta G_m=0$

$\Delta H_m = T_m(d\Delta G/dT)$

ΔC_p = declividade do gráfico ΔH vs T

ΔH = declividade do gráfico $-R \ln K$ vs $1/T$. Se ΔH for constante, significa que ΔC_p é zero.

3.3.2. Estimativa da composição de elementos de estrutura secundária.

A determinação da composição dos elementos de estrutura secundária da amostra purificada foi realizada por meio da deconvolução do espectro de CD a 20 °C, uma vez que nesta condição, a proteína está totalmente enovelada (100% no estado nativo) por meio do programa CDNN. O resultado desta análise foi comparado com a estrutura 3D modelada de modo a corroborar os dados teóricos (modelagem) com os experimentais (dados de CD) e, garantir que a proteína de interesse foi utilizada nos ensaios.

3.4. Modelagem da estrutura 3D da espermedesina ovina.

A estrutura tridimensional da espermedesina de ovinos da raça Texel ainda não foi determinada por métodos experimentais. A determinação da estrutura desta proteína permitirá um maior entendimento a respeito da variabilidade estrutural destas proteínas, bem como servirá para validar os dados obtidos por dicróismo circular.

Contudo, a obtenção da estrutura por métodos experimentais, como a difração de raios-X é um processo bastante demorado. Por isso a estrutura da espermedesina ovina foi obtida pelo método de modelagem por homologia.

3.4.1. Modelagem da espermedesina ovina.

A estrutura da espermedesina de touro (*Bos taurus*) depositada no PDB (ROMERO et al., 1997) (pdbid: 1sfp) foi utilizada como molde para modelagem da ovina, por ter maior identidade entre as seqüências de aminoácidos. O processo de modelagem foi realizado utilizando o pacote de programas Modeller v9.14 (ESWAR et al., 2006). Foram gerados mil modelos da proteína na forma apo (livre) onde, os cinco melhores modelos foram escolhidos com base nos parâmetros internos de qualidade do programa Modeller (score do programa). Destes cinco, o melhor foi escolhido com base na qualidade estereoquímica avaliada pelo programa Procheck (CCP4, 1994).

3.5. Dinâmica molecular.

3.5.1. Dinâmica molecular da espermedesina ovina

Uma dinâmica molecular foi realizada para verificar a estabilidade do modelo gerado da espermedesina ovina. Para esta técnica, foi utilizado o pacote de programas VMD/NAMD (PHILLIPS et al., 2005) para dinâmica e visualização. O campo de força utilizado foi o Charmm C35b2_C36a2 (MacKerell, 1998). Todas as dinâmicas foram realizadas com a proteína imersa em uma caixa com água simulando condições de contorno periódicas, íons Na⁺ em quantidade suficiente para neutralização das cargas do sistema pois a vida não existe em uma carga líquida, temperatura de 300K, 1 atm de pressão e pH 7,0. Para esta última condição, os grupos ionizáveis foram ajustados para sua condição de protonação em pH 7,0. O tempo de dinâmica foi estabelecido mediante o sistema ter atingido o equilíbrio termodinâmico, verificado com base na variação do rmsd dos carbonos alfa da proteína em função do tempo.

3.6. Cristalização da proteína.

3.6.1. Cristalização da espermedesina ovina.

Para a cristalização da espermedesina ovina, foi utilizado o método da gota pendurada (*hanging drop*), conforme Figura 7.

Primeiro foi necessário descobrir qual a melhor condição para formação de cristais da espermedesina, identificando o melhor pH e a melhor concentração de precipitante. Para isso, foi realizado uma varredura (*screening*) de substâncias precipitantes e diferentes tampões para escolher condição ideal de cristalização. A condição ideal de cristalização encontrada foi a que possuía como precipitante polietileno glicol 3.350 a 33% dissolvido em tampão acetato de amônio, 50 mM, pH 6,5. A solução da gota pendurada consistia de 3 μ L de solução de proteína purificada e 2 μ L da solução precipitante.

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da proteína.

O método de purificação por cromatografia é uma ferramenta tradicional e bastante confiável para se obter proteínas isoladas. Devido a espermedesina ser a proteína mais abundante do plasma seminal, é possível obtê-la por este método com rendimento considerável. A Figura 8 mostra o padrão de eluição cromatográfica do plasma seminal de ovinos da raça Texel nas condições estabelecidas na metodologia.

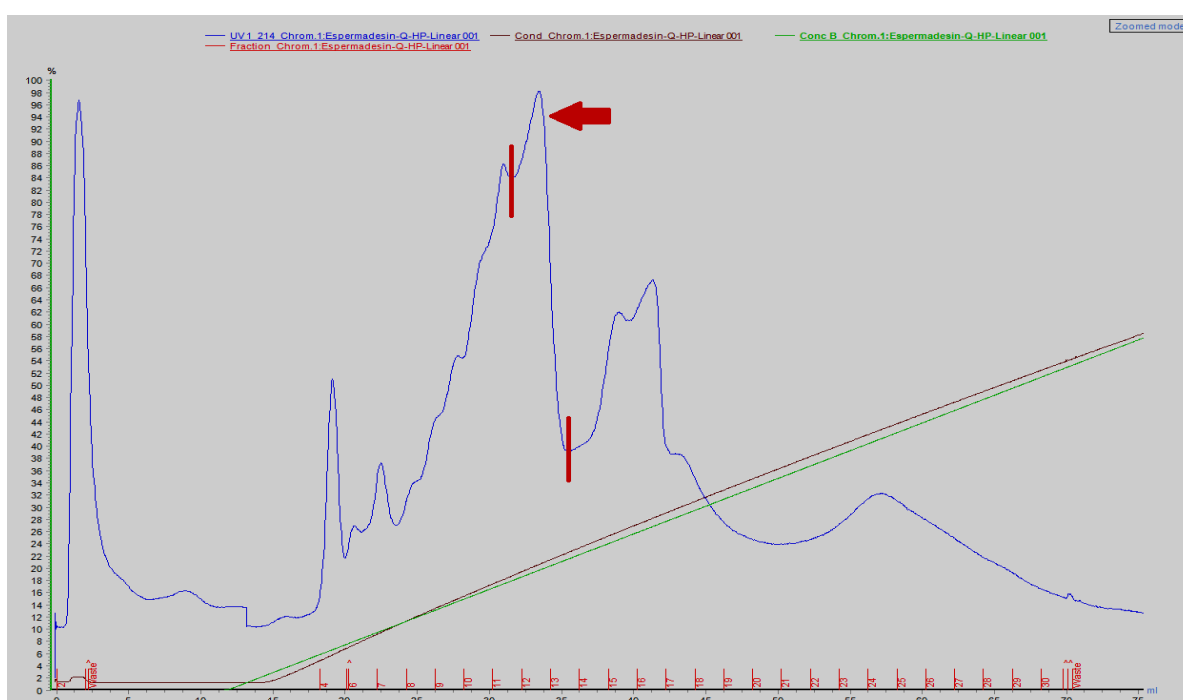


Figura 8. Perfil de eluição cromatográfica do plasma seminal de ovinos da raça Texel, destacando o pico contendo a fração com a espermedesina.

Inicialmente foi inserida no cromatógrafo uma solução de plasma seminal a 7% dissolvido em tampão A, pois a quantidade de proteína na amostra era tanta que iria saturar a resina e poderia provocar o entupimento dos capilares do equipamento.

Após a coleta das frações a cada 2 ml, procedeu-se a identificação da espermedesina por meio de uma eletroforese SDS-PAGE corada com nitrato de prata (Figura 9). A espermedesina estava presente do quinto ao décimo poço, porém, bem concentrada nos poços seis e sete, os quais correspondem ao pico de eluição mostrado na Figura 8, sendo coletada nos tubos 11 e 12.

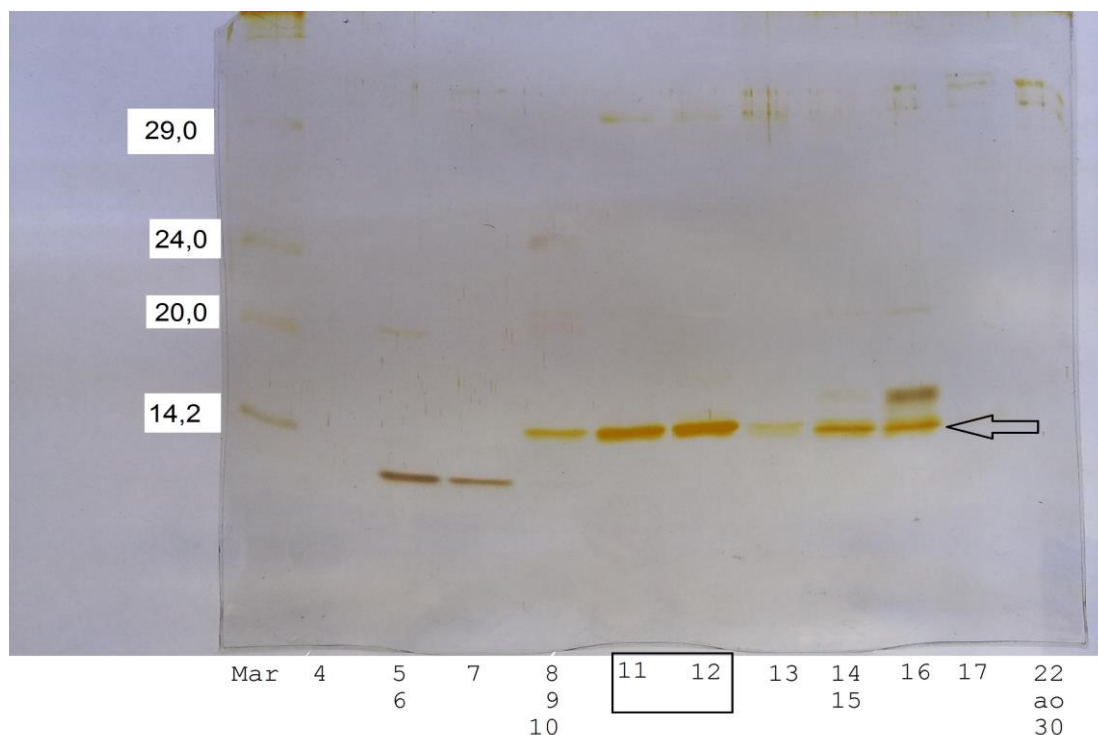


Figura 9. Gel de SDS-PAGE mostrando as frações com a espermedesina isolada, a qual apresenta peso molecular de 14 KDa.

Após a confirmação da identificação da proteína por meio de eletroforese, procedeu-se com as demais análises.

4.2. Determinação dos parâmetros biofísicos por Dicroísmo Circular (CD).

As condições utilizadas na análise de CD foram: Concentração da proteína: $(1,0 \text{ mg.mL}^{-1})$ diluída em tampão fosfato 10mM + β -mercaptoetanol 500 μ M, pH 7,5, cubeta com caminho óptico de 0,5 mm.

A Figura 10 apresenta os espectros de CD obtidos com a desnaturação térmica gradual da espermedesina nas condições citadas na metodologia.

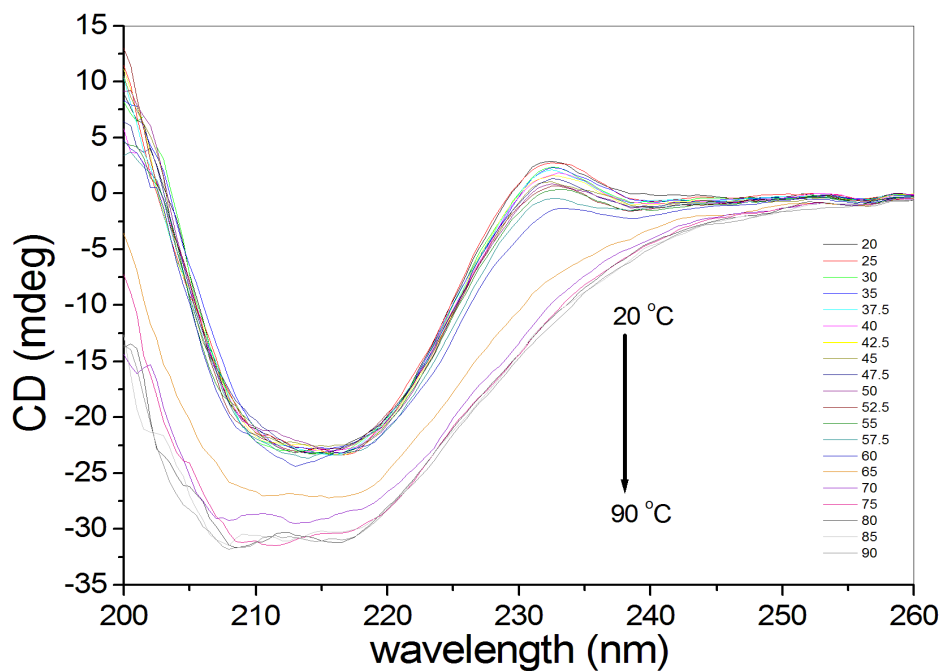


Figura 10. Variação do espectro de dicroísmo no UV em função do aquecimento.

De modo a detalhar melhor a região de transição do estado nativo para o desnaturado, foram coletados espectros a cada 2,5 °C entre 35 e 60 °C.

A variação da elipicidade (CD) nos comprimentos de onda 210 e 210,5 nm foi graficada em função do aumento da temperatura (Figura 11).

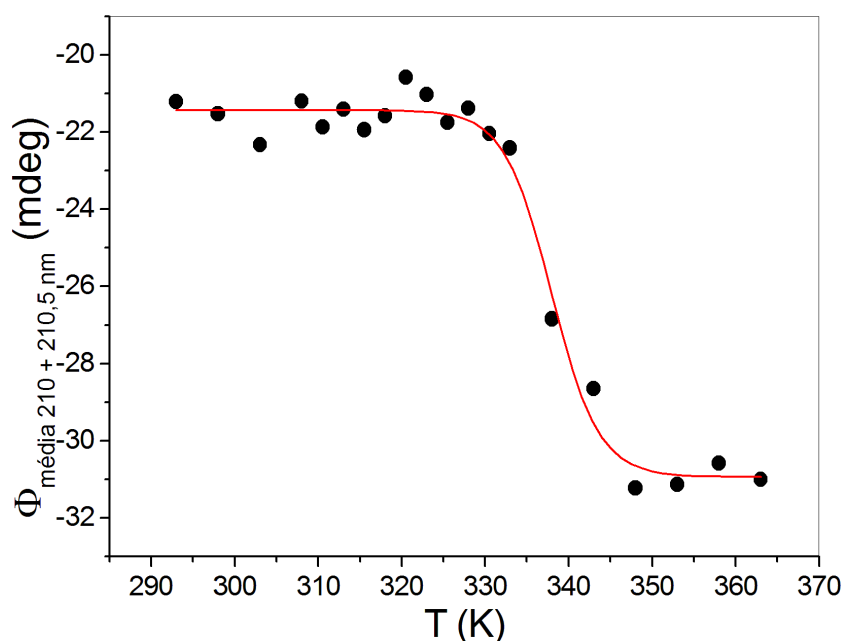


Figura 11. Variação da elipicidade média em 210 e 210,5 nm em função da temperatura.

Para cada ponto experimental da Figura 10, foi calculado o ΔG em função da temperatura (Figura 12) de acordo com a equação 6, que correlaciona a f_D/f_N .

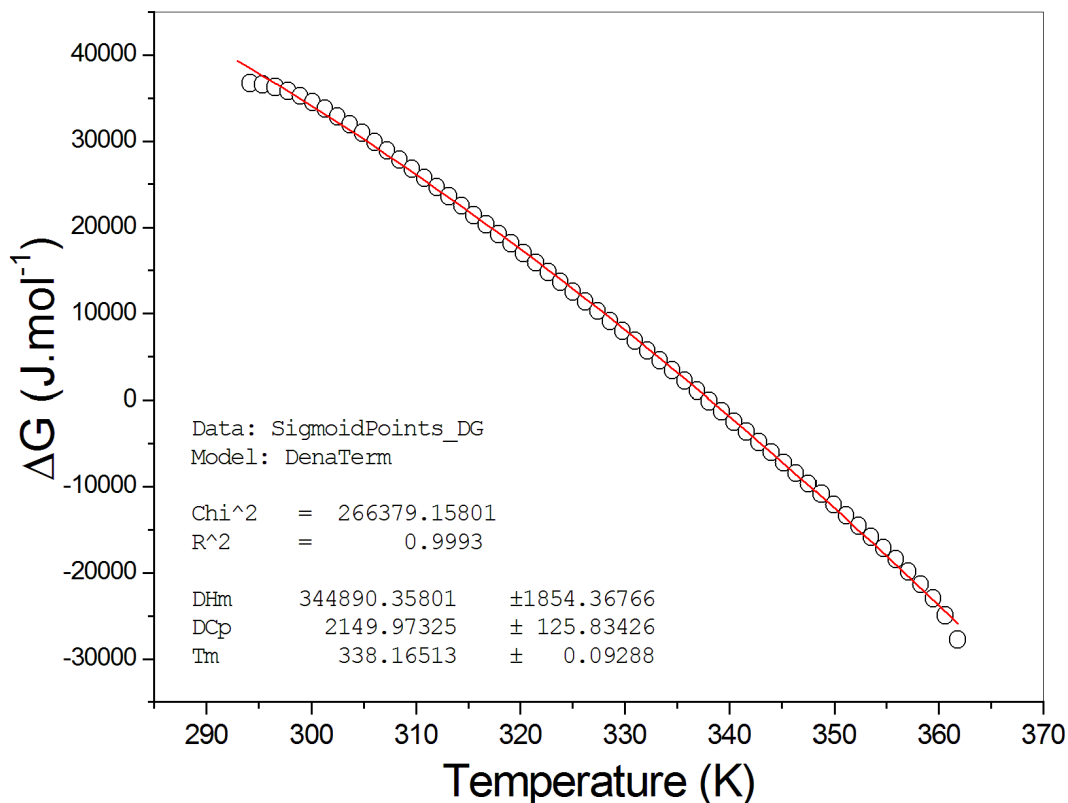


Figura 12. Variação do ΔG em função da temperatura (equação 7). A linha vermelha corresponde ao melhor ajuste da equação 7 aos pontos experimentais.

A equação 8 foi ajustada aos pontos experimentais da Figura 12. Assim, para que a equação se ajustasse bem aos pontos, os parâmetros T_m , ΔH_m e ΔC_p , teriam que assumir um dado valor, valores estes que são apresentados abaixo:

$$\begin{aligned}\Delta H_m &= 344,9 \text{ kJ/mol} \quad (\pm 1,85) \\ \Delta C_p &= 2,2 \text{ kJ/mol.K} \quad (\pm 0,13) \\ T_m &= 338,2 \text{ K ou } 65,2 \text{ }^\circ\text{C} \quad (\pm 0,09)\end{aligned}$$

Outra informação importante que é possível extrair a partir do espectro de CD em condições não desnaturantes (20 °C) é a composição da proteína em termos de elementos de estrutura secundária. Para isso, o espectro

coletado a 20 °C foi analisado pelo programa CDNN (Figura 13), o qual confirmou que a folha beta é o componente majoritário do espectro.

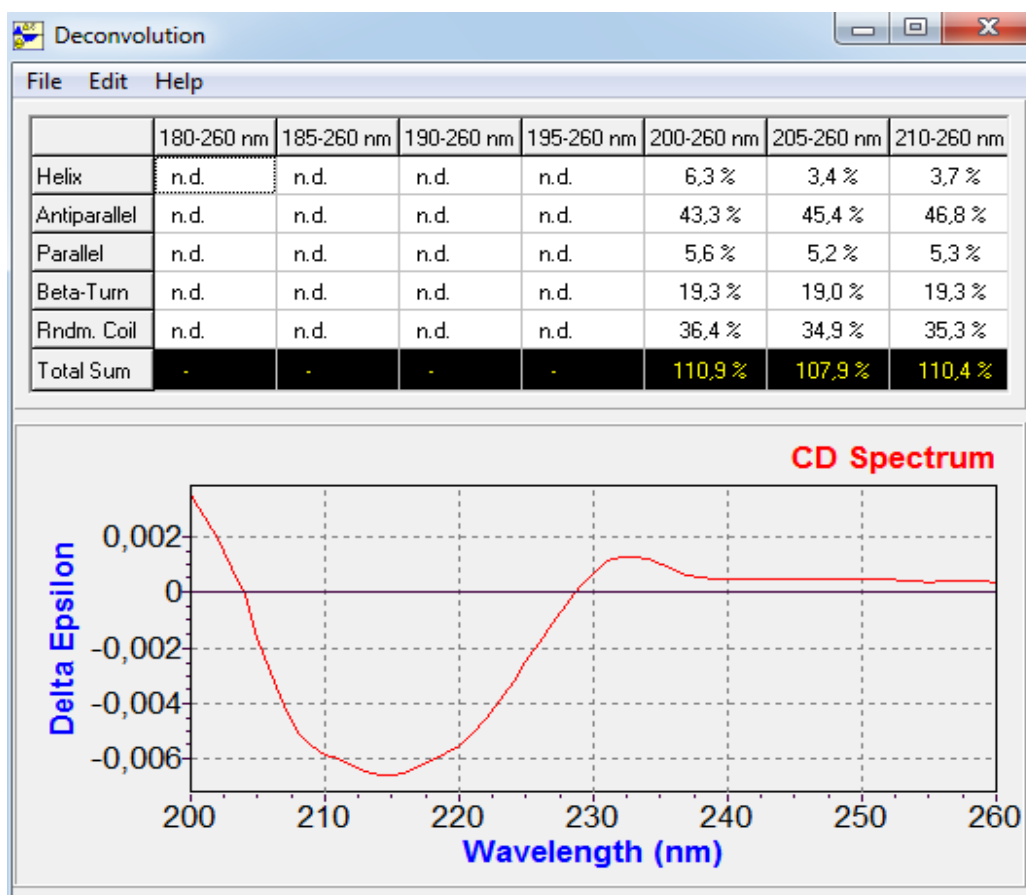


Figura 13. Tela do programa CDNN mostrando a composição secundária da espermedesina ovina a partir do espectro de CD a 20 °C.

Detalhes da deconvolução do espectro de CD e a comparação de seus resultados com o modelo teórico e com dados semelhantes de espermedesina de bode são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Comparação da porcentagem de elementos de estrutura secundária observados na proteína purificada a partir da espectroscopia de CD, com a porcentagem encontrada na estrutura modelada e a porcentagem observada na espermedesina recombinante de bode.

Elemento de estrutura	CDNN % (média 3 últimas colunas)	Estrutura modelada VADAR Server %	Espermedesina recombinante de Bode (<i>Capra hircus</i>)*
Hélice	3,4	2,0	3,0
Folha-β	50,6	68,0	46,0
Beta turn	19,0	14,0	31,0
Coil	34,9	28,0	20,0
Total	107,9	112,0	100,0

* (Nascimento et al., 2012)

Os resultados mostrados na tabela 1, indicam que a composição secundária da espermedesina ovina estimada a partir de dados experimentais (espectro de CD) coincide com o que é observado na estrutura modelada 3D (dados adiante). Além disso, a composição secundária da espermedesina ovina está de acordo com o observado na literatura (Nascimento et al., 2012) que mostra que na espermedesina recombinante de bode (*Capra hircus*) apresenta folha- β (46%) como sendo o componente predominante sobre os outros elementos que incluem α -hélices (3%), voltas (31%) e elementos desordenados (20%).

4.3. Modelagem por homologia da estrutura 3D da espermedesina.

A sequência de aminoácidos da espermedesina de *Ovis aries* foi obtida na base de dados Uniprot (uniprot id: w5pek8). A partir dela, foi realizado um BlastP contra a base de dados PDB para a busca de moldes estruturais. Os resultados (Figura 14) mostram que a espermedesina de touro (*Bos taurus*) possui 79% de identidade com a espermedesina ovina.

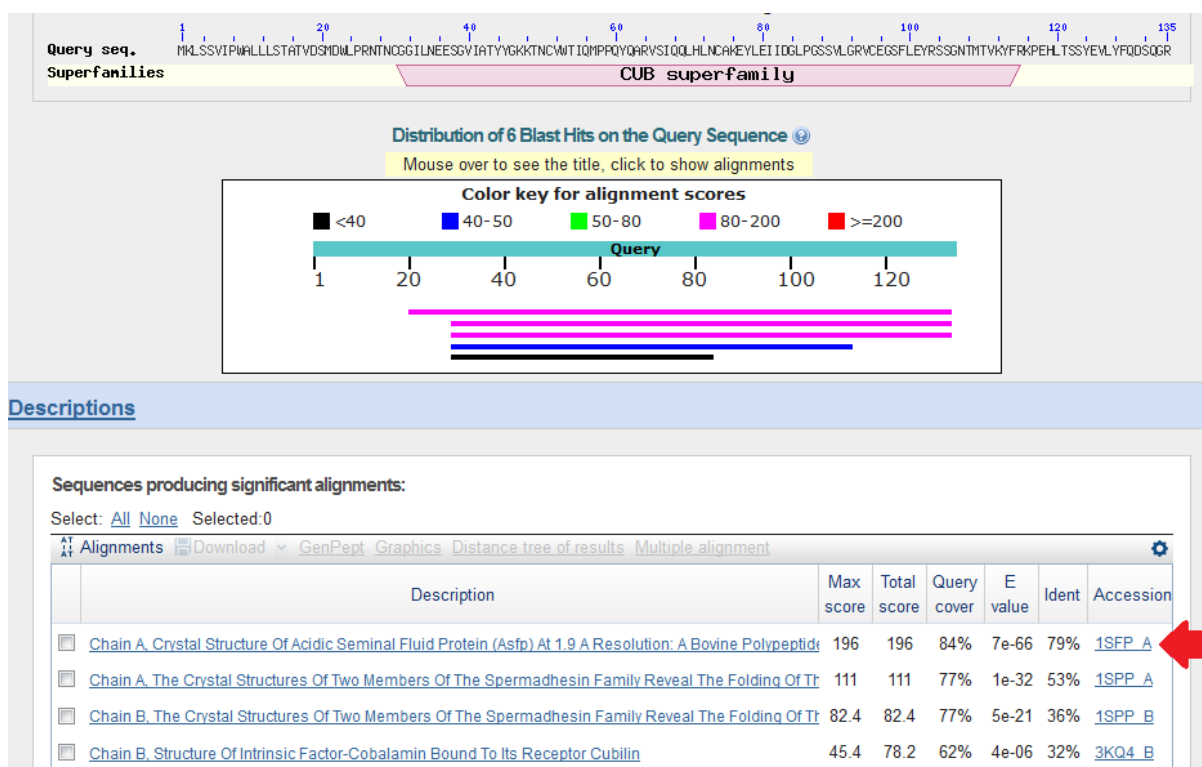


Figura 14. BlastP contra a base de dados PDB indicando a identidade e identificação da proteína molde.

O melhor modelo da espermedesina ovina selecionado dentre os 1000 modelos gerados pelo programa Modeller está representado na Figura 15.

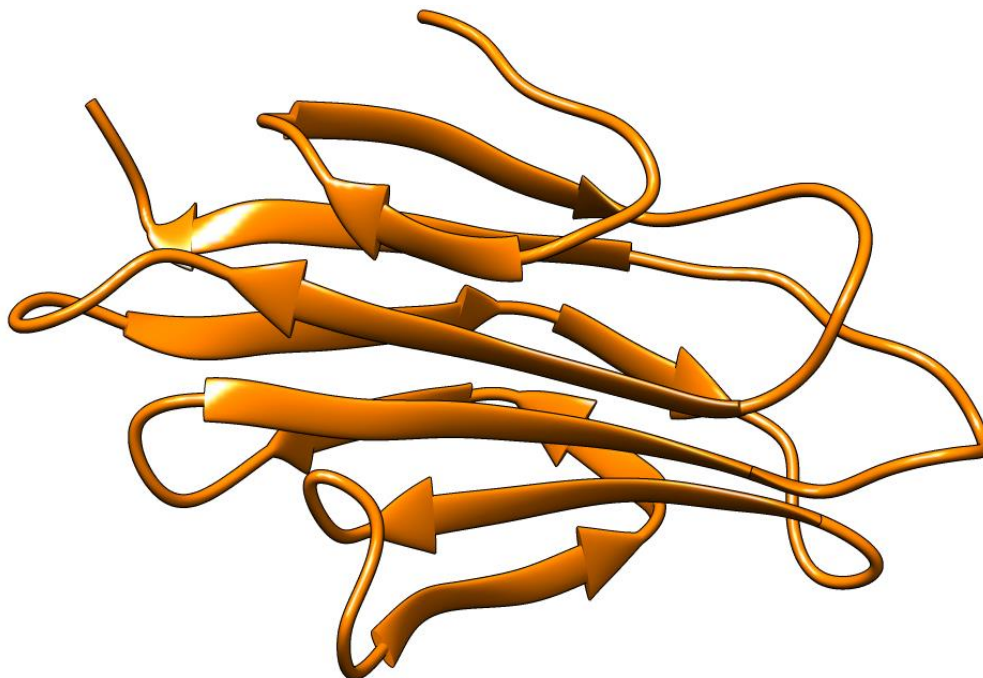


Figura 15. Estrutura em fita representando o modelo gerado da espermedesina ovina. Destacam-se os elementos de estrutura secundária como folhas- β e as alças e voltas (elementos desordenados).

O modelo gerado por homologia da espermedesina ovina possui melhor qualidade estereoquímica em relação ao seu molde, estando com 96,8% dos seus resíduos nas regiões permitidas do gráfico de Ramachandram, contra 92,3% dos resíduos do seu molde nesta mesma região (Figura 16).

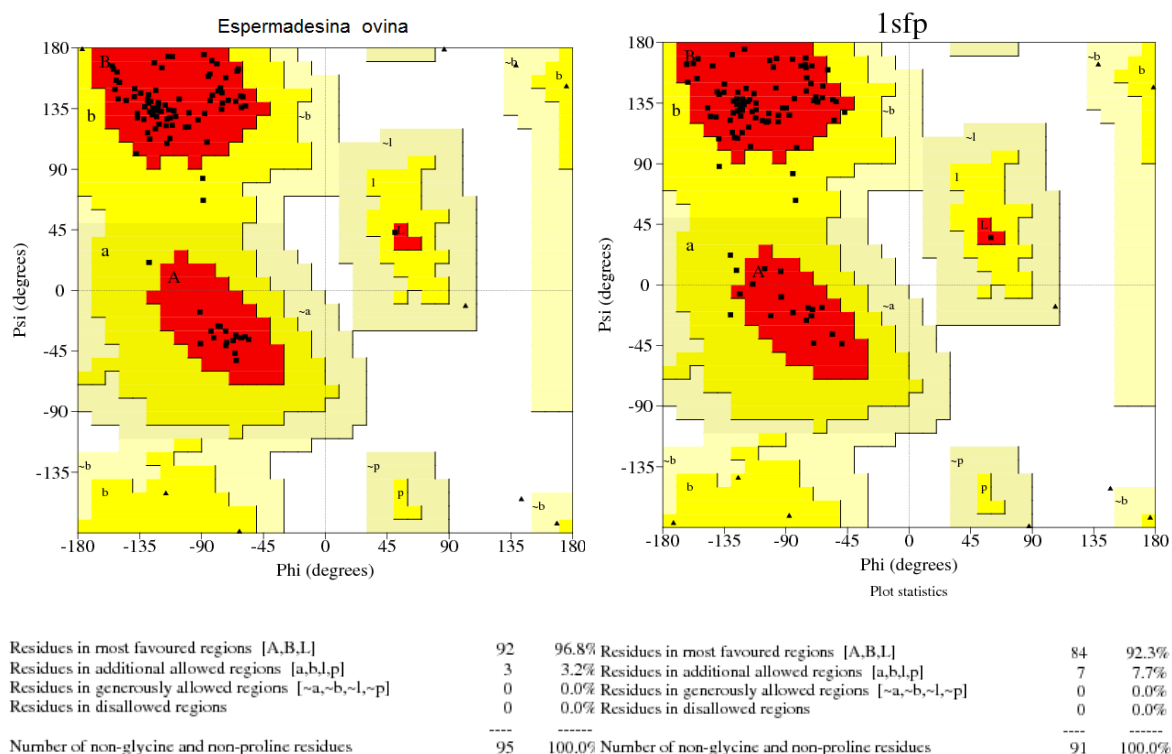


Figura 16. Gráfico de Ramachandram mostrando a qualidade estereoquímica do modelo da espermadesina ovina e do seu molde cristalográfico.

O modelo 3D da espermadesina ovina, pôde então ser utilizado para comparação de seus elementos de estrutura secundária com o que foi observado a partir de dados experimentais de espectroscopia de dicroísmo circular (capítulo 4.2). O fato de o modelo teórico estar em concordância com os dados experimentais de espectroscopia confirma que a proteína isolada por cromatografia é de fato a proteína de interesse neste estudo. As propriedades estruturais do modelo também puderam ser avaliadas por dinâmica molecular.

4.4. Dinâmica molecular da estrutura 3D da espermadesina ovina.

A dinâmica molecular é um método de simulação computacional que estuda o movimento dos átomos e das moléculas em função do tempo sob condições variadas de temperatura, pressão, pH ou de outras forças.

A simulação da estrutura da espermadesina em condições fisiológicas indicou que o modelo gerado atingiu equilíbrio termodinâmico a partir de 7 nano segundos (ns) de simulação e permaneceu assim até 100 ns (Figura 17).

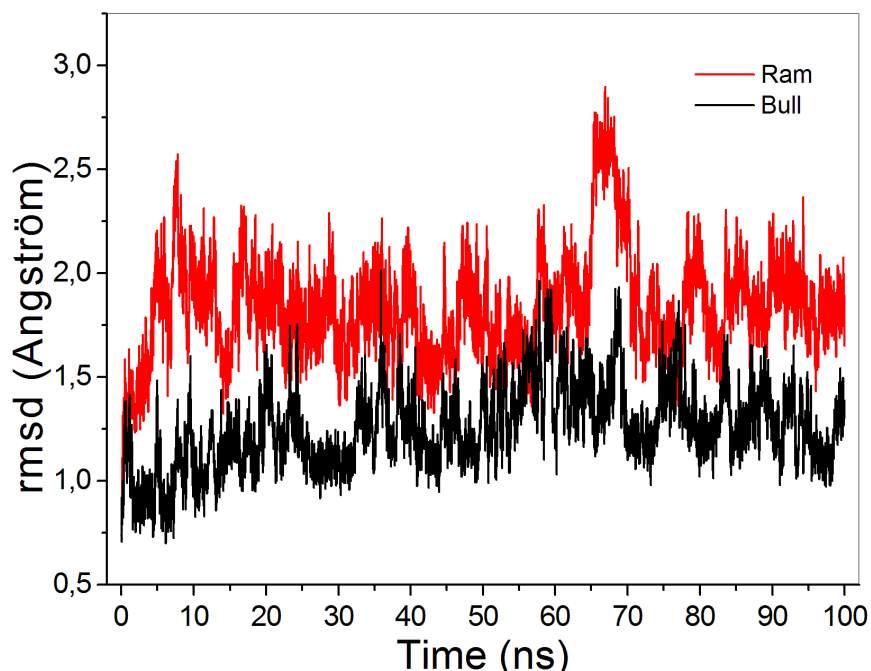


Figura 17. Gráfico de RMDS mostrando oscilação dos átomos da cadeia principal da espermedesina em função do tempo. A oscilação apresentada no gráfico é obtida comparando-se a distância de cada átomo em relação a posição mesmo átomo na estrutura de referência (minimizada).

É possível observar na Figura 17 que o rmsd calculado a partir dos átomos da cadeia principal da espermedesina, oscila em uma frequência constante (equilíbrio) em torno de 1,7 Å, num plateau constante, o que é considerado uma variação pequena e, sugere que a proteína é estável. Apesar de sofrer uma oscilação maior que a espermedesina de touro, a oscilação se mantém constante ao longo do tempo indicando estabilidade.

A partir desta simulação também foi possível observar se a oscilação de 1,7 Å poderia causar o desenovelamento da proteína. A Figura 18 mostra que o raio de giro calculado ao longo do tempo, permaneceu constante ao longo de toda a simulação para ambas as proteínas. Se este raio tivesse aumentado, significa que a proteína estaria se desenovelando, se estivesse diminuindo, significaria que a proteína estaria entrando em colapso. Contudo, o valor constante observado, indica que a proteína não se desenovelou.

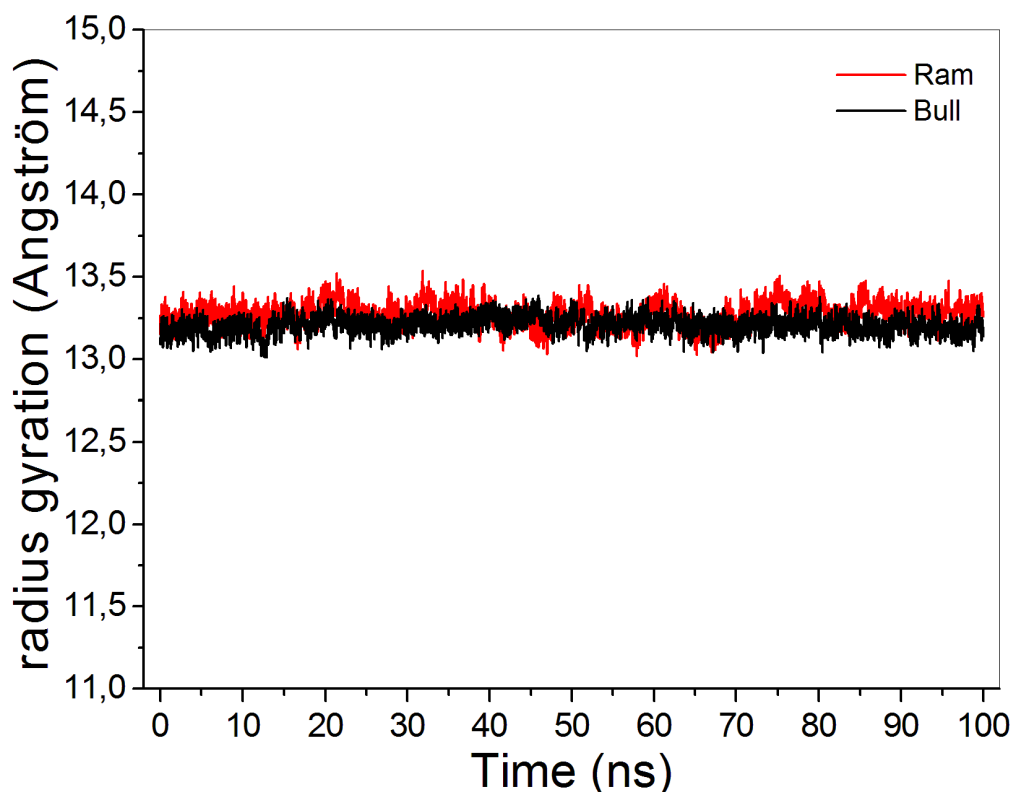


Figura 18. Gráfico mostrando a variação do raio de giro calculado para os átomos da cadeia principal da espermedesina em relação a estrutura inicial de referência (minimizada).

Por meio da simulação de dinâmica molecular, também foi possível avaliar quais são os resíduos que mais oscilaram ao longo do tempo, ou seja, permite identificar a região da molécula com maior flexibilidade estrutural. A Figura 19 mostra a raiz quadrada média da flutuação (rmsf) calculada para os carbonos alfa ($C\alpha$) de cada resíduo da espermedesina nos últimos dez ns de simulação, pois neste tempo, a proteína já se encontrava em equilíbrio termodinâmico. Deste modo, é possível identificar quais regiões da proteína teriam maior mobilidade em solução.

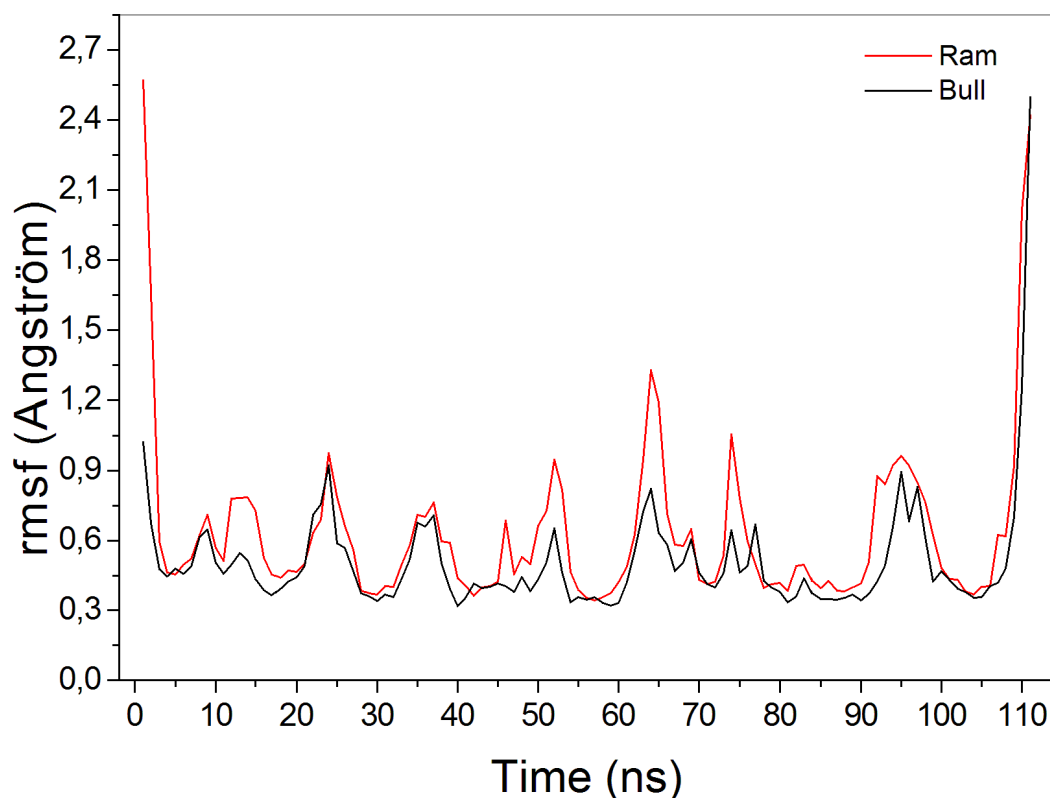


Figura 19. Gráfico de RMSF mostrando a oscilação do $C\alpha$ calculado para cada resíduo de aminoácido nos últimos cinco ns de simulação.

De acordo com a Figura 19, as regiões da epermadesina com maior flexibilidade são a região N-terminal (resíduos 1 ao 5) e a região C-terminal (resíduos 108 a 111). A flexibilidade aumentada destas regiões já é esperada para a grande maioria das proteínas, por serem segmentos que normalmente não assumem nenhum padrão de enovelamento (regiões desordenadas), portanto, com maior grau de liberdade de movimento em ambas as estruturas. Isso explica o motivo da estrutura do molde (espermadesina de touro) utilizada na modelagem iniciar sua sequência de aminoácidos no resíduo 4, pois, devido a alta flexibilidade da região C-terminal, uma região desordenada, provavelmente os polipeptídeos de 1 a 3 não assumiram uma ordem dentro da rede cristalina e, portanto, não difrataram raios-X, não sendo possível assim, a geração de informação experimental que permitisse a identificação precisa de sua posição.

4.5. *Cristalização da espermedesina ovina.*

Como ainda não há estrutura cristalográfica da espermedesina ovina depositada no PDB, realizou-se uma varredura para identificar a melhor condição de cristalização desta proteína, com o intuito de determinar sua estrutura tridimensional por difração de raios-X. O resultado da triagem mostrou que a melhor condição de cristalização ocorreu com concentração de precipitante polietileno glicol 3.350 a 33%, dissolvido em tampão Acetato de Amônio, 50 mM, pH 6,5. Cristais da espermedesina ovina cresceram nestas condições, após quarenta dias em temperatura controlada de 25 °C, no escuro (Figura 20).

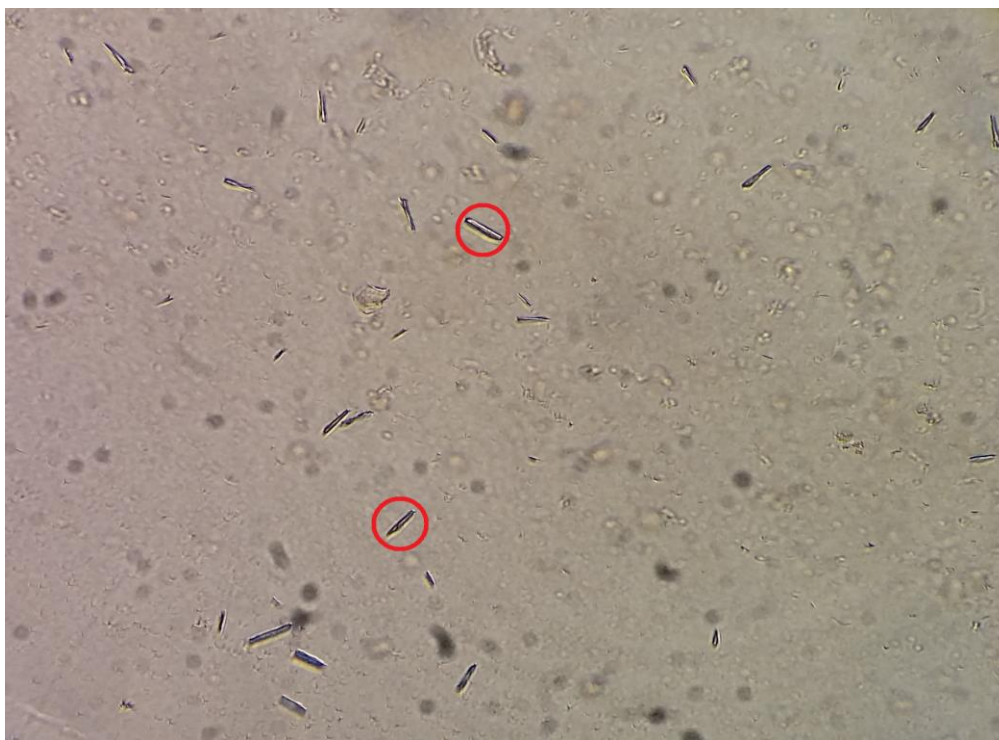


Figura 20. Presença de microcristais de espermedesina ovina.

O fato de termos obtidos microcristais mostra que encontramos a condição em que eles crescem, porém, os cristais apresentaram um tamanho muito reduzido para realização de experimentos de difração, sendo necessário ajustar as condições como pH e/ou concentração do precipitante, de modo a obtermos cristais mais viáveis (maior tamanho e volume) ao experimento de difração de raios-X. Contudo, devido a falta de amostra, não foi possível repetir este experimento.

5. DISCUSSÃO

A sequência de aminoácidos da espermedesina ovina possui 135 resíduos de aminoácidos, sendo que os resíduos de 1 a 20 remetem a um peptídeo de sinalização para a via secretora (meio extracelular). Já os resíduos de 21 a 135 correspondem a espermedesina propriamente dita. A análise dos resíduos que compõe a estrutura da espermedesina ovina pelos servidores NetOGlyc 4.0 (STEENTOFT et al., 2013) e GlycoEP (CHAUHAN et al., 2013) indicaram que não há sítios de glicosilação na proteína, portanto, muito provavelmente trata-se de uma proteína não glicosilada.

Existem apenas três estruturas de espermedesinas depositadas no PDB, sendo uma de touro (*Bos taurus*, pdbid: 1sfp) e duas de suíno, chamadas de PSP-I e PSP-II (*Sus scrofa*, pdbid: 1spp) (ROMERO et al., 1997) onde, a PSP-I e PSP-II são glicosiladas em sítios diferentes (resíduo 71 na PSP-I e resíduo 119 na PSP-II).

A espermedesina de carneiro da raça Texel possui uma estrutura tridimensional semelhante às demais espermedesinas depositadas no PDB. Ao compararmos a porcentagem de elementos de estrutura secundária da espermedesina obtida por modelagem com a porcentagem fornecida pela espectroscopia de CD, observamos que a quantidade de alfa-helices e folhas-beta são muito parecidas (Tabela 1). A maior diferença está na porcentagem de elementos desordenados, sendo 34,9% na estrutura purificada (CD) e um pouco menor 28,0% na estrutura modelada. Esta diferença é justificada, pois, na estrutura modelada estão faltando os três primeiros resíduos de aminoácido que, muito provavelmente assumem uma conformação desordenada. Se acrescentássemos estes resíduos desordenados a estrutura modelada, estimamos que a porcentagem deste elemento seria muito mais semelhante aquela encontrada na proteína isolada.

Tabela 2. Comparação dos elementos de estrutura secundária das estruturas 3D das espermedesinas, por meio do servidor VADAR.

Elemento de estrutura	<i>Ovis aries</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa (PSP-I)</i>	<i>Sus scrofa (PSP-II)</i>
Hélice- α	2,0	0,0	0,0	0,0
Folha- β	68,0	68,0	69,0	66,0
Beta turn	14,0	14,0	14,0	14,0
Coil	28,0	31,0	30,0	33,0
Total	112,0	113,0	113,0	113,0

Apesar do enovelamento muito parecido destas quatro proteínas (Figura 22 A, B, C), a identidade entre elas é de apenas 22,2%. Filogeneticamente, a espermedesina ovina é muito mais próxima da de touro (Figura 21), por isso, sua maior identidade (78,3%). Além disso, a espermedesina de touro não possui sítio de glicosilação, assim como a de carneiro, ao passo que as espermedesinas de suíno, são ambas glicosiladas em sítios diferentes.

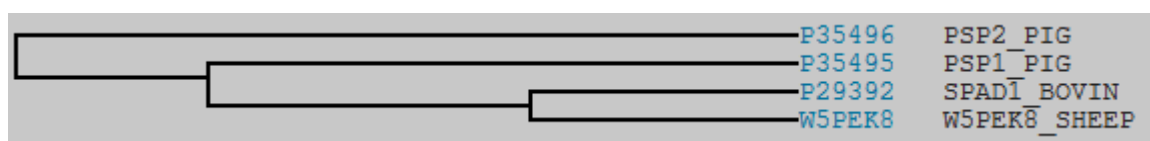


Figura 21. Cladograma mostrando a relação filogenética entre as estruturas de espermedesina de suíno, touro e de carneiro.

A Figura 22 mostra a sobreposição das estruturas cristalográficas das espermedesinas de touro, suíno e carneiro (modelada). As espermedesinas de suíno (Figura 22D) apresentam maior variabilidade estrutural entre si, compartilhando uma identidade de apenas 37,1%. Contudo, Romero et al. (1997) descrevem que as espermedesinas PSP-I e PSP-II estariam associadas formando um heterodímero em sua unidade funcional (unidade biológica) no plasma seminal.

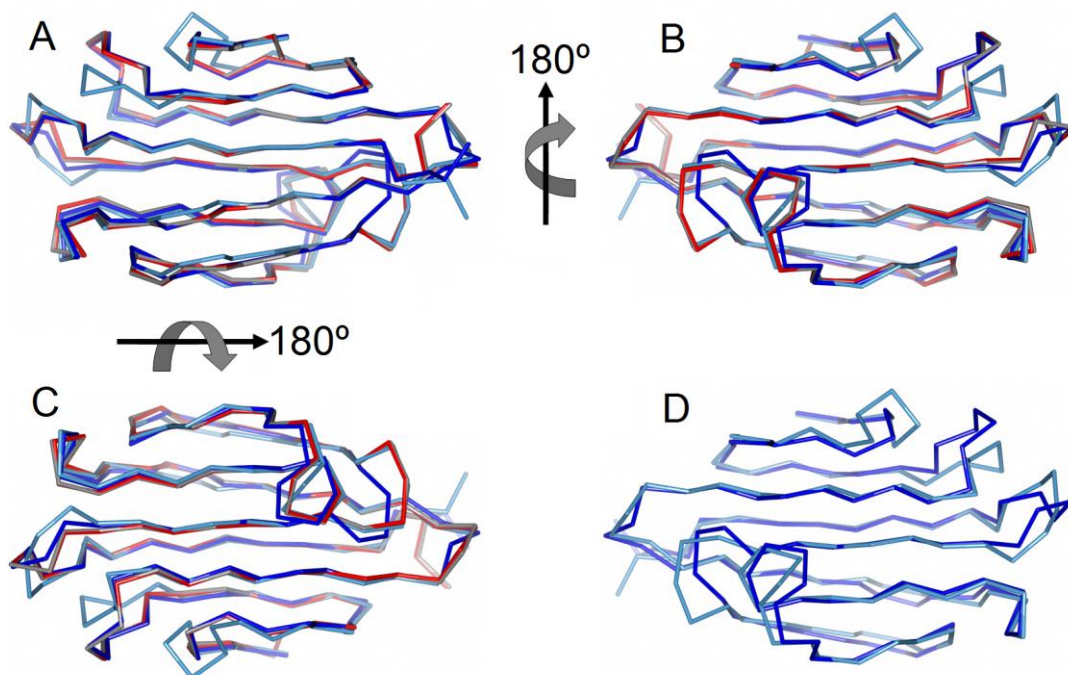


Figura 22. Sobreposição das estruturas das espermedesinas de Carneiro (vermelho), Touro (cinza), suíno PSP-I (azul escuro) e suíno PSP-II (azul claro).

Em relação as suas propriedades biofísicas, a espermedesina ovina se desenrola com uma T_m de 338,2 K (65,2 °C). Isso significa que esta proteína consegue suportar altas temperaturas sem se desenrolar, conservando suas propriedades. Essas propriedades teriam um efeito importante na manutenção integridade do esperma em condições adversas, como por exemplo, nas temperaturas mais altas do trato genital feminino em relação ao epidídimo, onde os espermatozoides ficam armazenados. A alta T_m se deve a presença de duas pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína 7 com 28 e, 51 com 72, o que foi confirmado na estrutura modelada. Pontes dissulfeto são ligações covalentes entre resíduos de aminoácidos cisteína, portanto, é necessária uma alta energia fornecida por altas temperaturas para rompê-las (LEHNINGER, et al., 2000).

Devido ao baixo volume de ejaculado dos caprinos e consequentemente baixa obtenção de espermedesina, Nascimento et al., (2012) realizaram a produção de espermedesina recombinante de bode (rBdh-2His), e posteriormente realizaram a purificação e análises de CD dessa proteína. No seu experimento de CD, cada espectro foi coletado em uma temperatura distinta entre 5°C até 55°C em intervalos de 5°C, onde os resultados mostraram que a espermedesina recombinante de bode se desnatura a uma temperatura de 42°C. Estes autores reportam que, por se tratar de uma proteína

recombinante, a rBdh-2His tem uma estabilidade térmica menor quando comparada com outras espermedesinas nativas, tais como as de suíno SFP, PSP-I, e PSP-II.

O fato ter-se obtido cristais da espermedesina ovina, mostra que encontrou-se a condição em que eles crescem, sendo necessários agora, pequenos ajustes para que se obtenha um mono cristal com tamanho e volume suficientes para ser utilizado em experimentos de difração de raios-X. A determinação da estrutura cristalográfica da espermedesina ovina irá contribuir para o melhor entendimento da relação estrutura-função desta família de proteínas, haja vista que só existem três exemplares desta família depositados no PDB.

Apesar desses dados experimentais de CD corroborarem para o modelo proposto para a estrutura da espermedesina, a base de dados PDB só permite o depósito de estruturas obtidas por meio de técnicas experimentais, não modelos teóricos. Contudo, as simulações de dinâmica molecular indicaram que esse modelo proposto para a espermedesina ovina é bastante estável, o que gera confiabilidade nas análises realizadas.

6. CONCLUSÃO

A espermedesina, o componente protéico mais abundante do plasma seminal de ovinos da raça Texel foi isolado com sucesso pelo protocolo estabelecido. A partir da proteína isolada, foi possível estabelecer que a espermedesina suporta temperaturas mais altas sem se desenovelar. E que o estado nativo é favorecido em relação ao estado desenovelado, garantindo estabilidade estrutural à proteína. Assim, a espermedesina pode ter um papel importante na manutenção da viabilidade dos espermatozoides em ambientes com temperatura mais elevada em relação ao epidídimo, como por exemplo, no interior do trato genital feminino.

7. REFERÊNCIAS

- BABINE, R. E. Abdel-Meguid SS Protein crystallography in drug discovery, Weinheim: Wiley-VCH. 2004.
- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**. v.71. p.461-470. 2005.
- BERGSTEIN, T.G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análises de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte. v.38, n.4, p.189-194, out./dez. 2014.
- BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; FILHO, A. L. R.; CHALHOUN, M.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino: Diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia. v.14, n.4, p.522-536, out./dez. 2013.
- BOE-HANSEN, G. B.; REGO, J. P. A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; BURNS, B. M.; McGOWMAN, M. R. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. **Animal Reproduction Science**. 2015.
- BORK, P.; BECKMANN, G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. **Journal Molecular Biology**. v.231, p. 539-545. 1993.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J. M.; GARCÍA, E. M.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MARTÍNEZ, E. A. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**. v.70. p.1352-1355. 2008.
- CAJAZEIRAS, J. B. **Espermadesinas caprinas (bodesinas): produção em sistema bacteriano**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Ceará – Faculdade de Veterinária. Fortaleza. 2009.
- CAJAZEIRAS, J. B.; MELO, L. M.; ALBUQUERQUE, E. S.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; CAVADA, B. S.; FREITAS, V. J. F. Analysis of protein expression and a new prokaryotic expression system for goat (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA. **Genetics and Molecular Research**. v.8. p.1147-1157. 2009.
- CALVETE, J.J.; MANNK, S. W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAID, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: Effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemistry Journal**. v.310. p.615-622. 1995.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40, jan/mar. 2011.

CARDOZO, J. A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUINO-BLANCO, T. CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**. v. 66. p.841-850. 2006.

CCP4 - Colaborative Computacional Project. A suite CCP4: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica. Section D**, biological crystallography, v. 50, n. 5, p. 760, 1994.

CHAUHAN, J. S.; RAO, A, RAGHAVA. In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in **Eukaryotic Protein Sequences**. PLoS ONE. 2013.

DOMÍNGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SÁNCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R. H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**. v.69. p.564-573. 2008.

DOSTALOVA, Z.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; HETTEL, C.; RIEDEL, D.; SCHONECK, C.; EINSPANIER, R.; TOPFER-PETERSEN, E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**. v.375. p.457-461. 1994.

DOSTÁLOVÁ, Z.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN. Quantitation of boar spermadhesins in sex gland fluids and in the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1200. p.48-54. 1994.

DRENTH, J.; MESTERS, J. **Principles of protein x-ray crystallography, 3rd ed.** New York. Springer. 2007.

ESWAR, N.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.Y.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Curr Protoc Bioinformatics**, Chapter 5: Unit 5 6, 2006.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J. A. M.; MORENO, F. B.; ANDRADE, T. S.; SANTOS, A. C. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; MOURA, A. A. Seminal plasma protein of adults boars and correlations with sperm parametrs. **Theriogenology**. v.82. p.697-707. 2014.

GOULARTE, K. L.; GASTAL, R. S.; GONÇALVES, A. O.; SCHNEIDER, J. R.; CORCINI, C. D.; LUCIA, T. Association between the presence of protein bands in ram seminal plasma and sperm tolerance to freezing. **Animal Reproduction Science**. v. 146, p.165-169. 2014.

HAASE, B.; SCHLOTTERER, C.; HUNDRIESER, M. E.; KUIPER, H.; DISTL, O.; TOPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. et al. Evolution of the spermadhesin gene family. **Gene**. v.352. p.20-29. 2005.

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

KATONA, G.; ANDREASSON, U.; LANDAU, E.M.; ANDREASSON, L.E.; NEUTZE, R. Lipidic cubic phase crystal structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.35 Å resolution. **Journal Molecular Biology** 321: 681-692. 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.227. p.680-685. 1970.

LATTMAN, E. E.; LOLL, P. J. Protein crystallography: a concise guide, Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2008.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, p.839. 2000.

LUNA, C.; COLÁS, C.; CASAO, A.; SERRANO, E.; DOMINGO, J.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRAIÁN-PÉREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm-zona pelucida interaction. **Theriogenology**, v.83, p.670-678, 2015.

MACKERELL, Jr., A. D.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK Jr., R.L.; EVANSECK, J.D.; FIELD, M.J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F.T.K.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D.T.; PRODHOM, B.; REIHER, III, W.E.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J.C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WIORKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D.; KARPLUS, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **Journal of Physical Chemistry** v. 102. p. 3586-3616. 1998.

MELO, L. M.; TEIXEIRA, D.I.A.; HAVT, A.; CUNHA, R. M.; MARTINS, D. B. G.; CASTELLETTI, C. H. M.; SOUZA, P. R. E.; FILHO, J. L. L.; FREITAS, V. J. F.; CAVADA, B. S.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. **Molecular Reproduction and Development**. v.75. p.8-16. 2008.

MOHAMMAD, R. M.; MASOOD, M.; MOHAMMAD, G. Effect of seminal plasma proteins on membrane cholesterol efflux of ram epididymal spermatozoa. **Small Ruminat Research**. v.129. p.88-91. 2015.

MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; MARTINS, J. A. M.; OLIVEIRA, R. V.; MENEZES, E. B. S. 2011. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte. v. 35, n.2, p.139-144. abr/jun. 2011.

NASCIMENTO, A. S. F.; CAJAZEIRAS, J. B.; NASCIMENTO, K. S.; NOGUEIRA, J. M. S.; SOUZA, B. L.; TEIXEIRA, E. H.; MELO, L. M.; CUNHA, R. M. S.; SILVA, A. L. C.; CAVADA, B. S. Expression, purification and structural analysis of recombinant rBdh-2His, a spermadhesin from buck (*Capra hircus*) seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**. v.24. p.580-587, 2012.

PHILLIPS, J. C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J.; TAJKHORSHID, E.; VILLA, E.; CHIPOT, C.; SKEEL, R. D.; KALÉ, L.; SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal Comput. Chem**, v. 26, n.16, p.1781-1802, 2005.

REINERT, M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MANN, K.; TOPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **European Journal Biochemistry**. v.242. p.636–640. 1996.

RÊGO, J. P. A. **Análise proteômica do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará – Centro de Ciências Agrárias – Departamento de Zootecnia. Fortaleza. 2010.

RÊGO, J. P. A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N. J.; CORBET, D. H.; BURNS, B. M.; BOE-HANSEN, G. B.; McGOWAN, M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**. 2014.

RICKARD, J. P.; LEAHY, T.; SOLEIHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; LYNCH, G. W.; DRUART, X.; de GRAAF, S.P. The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. **Journal of Proteomics**. 2015.

ROMÃO, M. J.; KOLLN, I.; DIAS, J. M.; CARVALHO, A. L.; ROMERO, A.; VARELA, P. F.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: a bovine polypeptide of the Spermadhesin Family. **Journal of Molecular Biology**. v.274. p.650-660. 1997.

ROMERO, A., ROMAO, M.J., VARELA, P.F., KOLLN, I., DIAS, J.M., CARVALHO, A.L., SANZ, L., TOPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structure Biology**. v.4. p.783-788, 1997.

STEENTOFT, C.; VAKHRUSHEV, S. Y.; JOSHI, H. J.; KONG, Y. VESTER-CHRISTENSEN, M. B.; SCHJOLDAGER, K. T.; LAVRSEN, K.; DABELSTEEN, S. PEDERSEN, N.B.; MARCOS-SILVA, L.; GUPTA, R.; BENNETT, E. P.; MANDEL, U.; BRUNAK, S.; WANDALL, H. H.; LEVERY, S. B.; CLAUSEN, H. *EMBO, J.* 32(10):1478-88, May 15, 2013.

SHERWOOD, D.; COOPER, J. **Crystals, X-rays, and proteins: comprehensive protein crystallography**. New York: Oxford University Press. 2011.

SILVA, S. V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte. v.35, n.4, p.370-384, out./dez. 2011.

SILVA, T.A.S.N. **Proteínas do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação espermática em ovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia

e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 102 p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2014.

SOLEIHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; KOHNKE, P. L.; DACHEUX, J. L.; GUÉRIN, Y.; GATTI, J. L.; de GRAAF, S. P.; DRUART, X. Ram seminal plasma proteome and its impact in liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v.109, p.245-260, jul.2014.

SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, G. B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F. C.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; FIGUEIREDO, J. R.; MOURA, A. A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**, v.75, p.4436-4456, 2012.

TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**. v. 267. p.6175–6179. 2000.

TEIXEIRA, D. I.A.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; HAVT, A.; BLOCH JR. C.; PRATES, M. V.; MORENO, F. B. M. B.; SANTOS, E. A.; GADELHA, C. A. A.; GADELHA, T. S.; CRISÓTOMO, E. S. M.; FREITAS, V. J. F. Isolation and partial characterisation of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. **Protein and Peptide Letters**. V.9. p.331-335. 2002.

TOPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P. F.; HUNDRIESER, M. E.; DOSTALOVA, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Spermadhesins: a new protein Family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**. V.30. p.217-224. 1998.

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; TSOLOVA, M. Glycobiology of fertilization in the pig. **International Journal of Developmental Biology**. 52: 717-736. 2008.

TREIN, Cristina Rodrigues. **Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida do plasma seminal equino e sua relação com a congelabilidade do sêmen**. Tese (doutorado) Faculdade de Veterinária Programa Pós-Graduação em Medicina Animal Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre 2011.

VARELA, P. F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMÃO, M. J.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The 2.4 Å Resolution crystal structure of boar seminal plasma PSPI/PSPII: A zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **Journal of Molecular Biology**. v.274. p.635-649. 1997.

VERLI, H. Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular. 1 ed. São Paulo: SBBq. 282 p. 2014.

WAHEED, M. M.; GHONEIM, I. M.; ALHAIDER, A. K.; Seminal plasma and sérum fertility biomarkers in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). **Theriogenology**. v.83. p.650-654. 2015.

X-ray crystallography in: **Structural_bioinformatics**. Disponível em: <http://www.molecularsciences.org/>. Acesso em 10/out/2011.

8. ANEXOS

8.1. Soluções para purificação da proteína no cromatógrafo.

8.1.1. Tampão "A"

Tris-HCl 20 mM pH 8,0

Tris	2,42 g
H ₂ O	800 mL
HCl 3M até	pH 8,0
H ₂ O q.s. p.	1000mL

8.1.2. Tampão "B"

Tris HCl 20 mM + NaCl 1M pH 8,0

Tris	2,42 g
NaCl	58,44
H ₂ O	800 mL
HCl 3M até	pH 8,0
H ₂ O q.s. p.	1000mL

8.2. Soluções para a eletroforese SDS – PAGE

8.2.1. Solução Gel de corrida

Para diferentes aplicações a porcentagem de acrilamida deve ser ajustada. Para a proteína espermedesina de carneiro Texel (que apresenta peso molecular de 12 KDa), utilizamos a concentração de 15% de acrilamida. Misturando os ingredientes mostrados abaixo, para preparar 30 mL de gel de corrida. Depois de adicionar o TEMED (um catalizador) e o persulfato de Amônio (APS) o gel polimeriza rapidamente, então este deve ser adicionado no momento em que o gel for derramado entre as placas.

Ingredientes	15%
H ₂ O	3,60 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,75 mL
20% (w/v) SDS	75 µL
Acrilamida/ Bis-acrilamida (30%/0,8% w/v)	7,5 mL
10% (w/v) persulfato de amônio	75 µL
TEMED	10 µL
TOTAL	15 mL

8.2.2. Solução do gel de empilhamento (4% Acrilamida).

Ingredientes	
H ₂ O	3,075 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 mL
20% (w/v) SDS	0,025 mL
Acrilamida/ bis-acrilamida (30%/0,8% w/v)	0,67 mL
10% (w/v) persulfato de amônio (APS)	0,025 mL
TEMED	0,005 mL
TOTAL	5,00 mL

Para a corrida da amostra utilizou-se duas placas e uma cuba Uniscience, correndo a 200 V com mA livre, totalizando o tempo de corrida de uma hora (LAEMMLI, 1970).

8.2.3. Fórmulas da soluções utilizadas na eletroforese SDS- PAGE.**SDS 20%**

SDS	5 g
H ₂ O q.s.p.	25 mL

ACRILAMIDA/BIS 30%

Acrilamida	30,0 g
Bis-Acrilamida	0,8 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

PERSULFATO DE AMÔNIO 10 % (preparar no dia do uso)

Persulfato de amônio	0,1g
H ₂ O q.s.p.	1,0 mL

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Tris	18,17 g
H ₂ O	70 mL
HCl 0,3M até	pH 8,8
H ₂ O q.s. p.	100,00 mL

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Tris	3,03 g
H ₂ O	40 mL
HCl 0,3M até	pH 6,8
H ₂ O q.s. p.	50,00 mL

TAMPÃO DE CORRIDA (1L, 1x concentrado)

Tris	1,5 g
Glicina	7,50 g
SDS	0,50 g
H ₂ O q.s.p.	500,00 mL

TAMPÃO DE AMOSTRA (5x concentrado)

β -mercapto-etanol	1,00 mL
SDS	0,50 g
Glicerol	1 mL
0,5M Tris-HCl pH 6,8	2 mL
<u>Azul Bromofenol</u>	<u>0,0025 g</u>
H ₂ O q.s. p.	0,50 mL

8.3. Fórmula para a coloração do gel, utilizando Nitrato de Prata.

Passo	Reagente	Volume	Tempo
1) Fixador	40 mL Etanol 10 mL Ácido acético H ₂ O q.s.p. 100 mL	100 mL	30 min
2) Redutor	0,1 g de Tiosulfato de Sódio 250 µL de Acetato de Sódio 4M 35 mL Etanol H ₂ O q.s.p. 100 mL	100 mL	30 min
3) Lavagem	H ₂ O destilada (100 mL)	100 mL	3 x 10 min
4) Prata	0,1 g Nitrato de Prata (AgNO ₃) 25 µL Formaldeído H ₂ O q.s.p. 100 mL	100 mL	30 min
5) Lavagem	H ₂ O destilada (200 mL)	2 x 200 mL	2 x 1 min
6) Revelador	2,5 g Carbonato de Sódio (Na ₂ CO ₃) 50 µL Formaldeído H ₂ O q.s.p. 100 mL	100 mL	Observar
7) Bloqueador	2 mL Ácido acético glacial Agitar por 5 minutos	2 mL	5 min

8.4. Protocolo utilizado para a cristalização da espermedesina de carneiro Texel.

Foi realizado uma varredura (screening) de substâncias precipitantes e diferentes tampões para escolher a condição ideal de cristalização. A condição ideal de cristalização foi a que utilizou como precipitante 33% de polietileno glicol 3.350, dissolvido em tampão acetato de amônio, 50 mM, pH 6,5. Sendo as fórmulas mostradas a baixo.

8.4.1. Tampão Acetato de Amônio 100 mM (solução estoque Tampão Acetato).

Acetato de Amônio	0,77 g
H ₂ O Milli-Q	50 mL
HCl para ajustar até	pH 6,5
H ₂ O Milli-Q q.s. p.	100 mL

8.4.2. Tampão Acetato de Amônio 50 mM (solução Tampão)

Tampão Acetato 100mM	25 mL
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	50 mL

8.5. Normas de publicação da revista ABMVZ

PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR

INTERMÉDIO DO SCHOLARONE

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é consentido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de Publicação

on-line do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.

- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.

- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).

- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.

- O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmitee” (Step 6). Esclarecemos

que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

□ **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências. O número de Referências não deve exceder a 30.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês na forma impessoal.

Formatação do texto

□ O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na

fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.

□ Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.
- **Autores e Afiliação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.
- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.
- **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco e no mínimo duas*.
* na submissão usar somente o *Keyword* (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto *keyword* (inglês) quanto palavra-chave (português), independentemente do idioma em que o artigo for submetido.
- **Introdução.** Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.
- **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.** (verificar o Item Comitê de Ética).
- **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
 - *Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o

indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

□ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota:

- Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
 - dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
 - mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
 - mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6^a ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

8.6. Artigo submetido

Purificação e caracterização estrutural e biofísica da proteína espermedesina do plasma seminal de ovinos da raça Texel

[*Purification and structural and biophysical characterization of spermadhesin protein of seminal plasma Texel sheep*]

Condessa, M. A. K. V^{1.}; Martinez, A. C^{2.}; Seixas, F. A. V³

¹Aluno do programa de pós-graduação do Programa de Mestrado em Produção Sustentável e Saúde Animal.

²Docente do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá.

³Docente do departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi descrever as características estruturais e biofísicas desta proteína de ovinos da raça Texel. Para isto amostras de sêmen de dois carneiros foram coletadas, o plasma separado, e a espermedesina isolada por técnicas de cromatografia de troca iônica. A pureza da amostra foi checada por SDS-PAGE e depois utilizada em estudos de desnaturação térmica por dicroísmo circular (CD). Sua sequência de aminoácidos foi utilizada para modelar sua estrutura tridimensional, a qual foi comparada com os dados experimentais de CD e teve sua estabilidade estrutural avaliada por simulações de dinâmica molecular. Os resultados mostraram que a proteína possui temperatura de desenovelamento de 65,2 °C e ΔH_m de 344,9 kJ/mol, superior ao descrito na literatura, que atribuímos a presença de duas pontes de dissulfeto em sua estrutura, a qual é composta essencialmente por elementos estruturais de folha-beta, assim como nas demais estruturas de espermedesinas conhecidas. Estas informações permitem concluir que a espermedesina pode ter um papel importante na manutenção da viabilidade dos espermatozoides em ambientes com temperatura mais elevada em relação ao epidídimo, como por exemplo, no interior do trato genital feminino.

Palavras-chave: espermatozoides, inseminação artificial, proteínas, reprodutores.

ABSTRACT

The objective of this work was to describe for the first time, the structural and biophysical characteristics of this protein in rams of Texel breed. To achieve this, semen samples from two rams were collected, the plasma separated and the spermadhesin isolated by ion exchange chromatography techniques. The purity of the sample was checked by SDS-PAGE and the protein then used for thermal denaturation studies by circular dichroism (CD). The amino acid

sequence of ram spermadhesin was used to model its three-dimensional structure, which was compared to the experimental data from CD. The structural stability of this protein model was also evaluated by molecular dynamics simulations. The results indicate that the protein had a melting temperature of 65.2 °C and a ΔH_m of 344.9 kJ.mol⁻¹, higher than the temperature described in the literature. We attribute it to the presence of two disulfide bonds in protein structure, which consists essentially of beta-sheet secondary elements, the same pattern observed in other known structures of espermadhesins. Those informations allows us to conclude that ram spermadhesin may play an important role in maintaining the viability of spermatozoa in environments with a higher temperature regarding to the epididymis, such as inside the female genital tract.

Key words: artificial insemination, breeder, proteins, spermatozoa.

INTRODUÇÃO

O ejaculado é composto por espermatozoides e o plasma seminal, uma mistura complexa rica em elementos orgânicos e inorgânicos, produzida pelos testículos, epidídimos e glândulas anexas, a sua composição em relação as proteínas varia entre as espécies e também entre os indivíduos, sendo esses componentes importantes na manutenção e viabilidade espermática (HAASE et al., 2005; CARDOZO et al., 2006; CABALLERO et al., 2008). O plasma seminal possui fatores que influenciam tanto o espermatozoide quanto o trato genital feminino durante o transporte espermático, sendo muitos desses fatores as proteínas (CABALLERO et al., 2008).

Proteínas são componentes do plasma seminal que influenciam na fertilidade e funções espermáticas, sendo estas divididas em três principais famílias nos animais ungulados: proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs), proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II (fn II) e proteínas da família das espermadhesinas (BERGERON et al., 2005).

Espermadhesinas são proteínas de baixo peso molecular (12 a 16 KDa) secretadas pelo trato genital masculino e glândulas anexas, ligadas a superfície dos espermatozoides e representam as principais proteínas encontradas no plasma seminal de algumas espécies, possuindo um domínio CUB em sua estrutura (ROMERO et al., 1997), sigla originária das primeiras proteínas identificadas com este domínio (BORK & BECKMAN, 1993): C de subcomponentes do complemento (Clr, Cls) U da proteína do embrião do ouriço-do-mar

(Uegf) e B da proteína 1 morfogenética do osso (Bmp1), o que pode ser atribuído as suas funções (CALVETE et al., 1995; VARELA et al., 1997; ROMÃO et al., 1997; HAASE et al., 2005; CABALLERO et al., 2008), sendo este estabilizado por meio de duas pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteínas vizinhas, onde os conhecimentos sobre o domínio CUB de dois membros da família espermedesina inicialmente foram revelados através da estrutura cristalina (CALVETE, et al., 1995).

As espermedesinas são consideradas pertencentes a uma classe de lectinas animais, sendo assim proteínas multifuncionais com capacidade de se ligar a carboidratos, inibidores de proteases e fosfolipídios, sugerindo funções em várias etapas da fertilização, entre elas a capacitação espermática (DOSTÀLOVÀ, et al., 1994; VARELA, et al., 1997; TOPFER-PETERSEN, et al., 1998; HAASE, et al., 2005; CABALLERO, et al., 2008). Sendo estas já identificadas em suínos, bovinos, equinos, caprinos e ovinos.

Dessa modo, objetivou-se com esse trabalho o conhecimento das características estruturais e biofísicas da espermedesina de Texel, para melhor compreender a função dessa proteína nesses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do sêmen

O sêmen utilizado foi coletado de dois carneiros adultos da raça Texel, para a coleta de sêmen foi realizada a técnica de eletroejaculação. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi centrifugado a 4500 RMP durante 15 minutos, para promover a separação do plasma seminal. Depois de separado o plasma foi armazenado em tubos criogênicos a -20° C, para que não ocorra perda das propriedades de interesse.

Purificação da proteína

A purificação da proteína foi obtida por meio da técnica cromatografia de troca-iônica, utilizando um cromatógrafo AKTA Pure M20 (GE Lifesciences), acoplado a uma coluna HiTrap Q HP (GE Lifesciences) com volume de 1 mL.

Foram aplicadas no cromatógrafo 1,5 mL de uma solução de plasma seminal a 7% dissolvida em tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) e eluída com tampão B (Tris-HCl 20 mM + NaCl 1,0M, pH 8,0). Alíquotas de 2 mL foram coletadas com um coletor automático de frações e, a amostra foi identificada por meio de eletroforese SDS-PAGE a 15% corada com Nitrato de Prata (LAEMMLI, 1970).

Avaliação dos parâmetros biofísicos da espermedesina

O estudo estrutural foi efetuado com o uso de um equipamento de dicroísmo circular. A proteína previamente isolada, foi submetida a aquecimento contínuo como forma de provocar sua desnaturação gradual.

Para isso, uma solução de 400 μL de espermedesina purificada ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm e acoplada em um espectropolarímetro de dicroísmo circular (CD) modelo Jasco J815. Foram coletados espectros de CD e de Absorbância entre os comprimentos de onda 190 a 300 nm. Cada espectro foi coletado em uma temperatura distinta entre 20 °C e 90 °C em intervalos de 5 °C. A variação espectral média em 210 e 210,5 nm foi utilizada para acompanhar a variação do espectro de absorção em função do aquecimento, de modo a determinar a temperatura de melting (T_m). A transição entre os estados Nativo e Desnaturado foi utilizada para se determinar a constante de desnaturação (K).

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (1)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (2)$$

Estimativa da composição de elementos de estrutura secundária.

A determinação da composição dos elementos de estrutura secundária da amostra purificada foi realizada por meio da deconvolução do espectro de CD a 20 °C, uma vez que nesta condição, a proteína está totalmente enovelada (100% no estado nativo) por meio do programa CDNN. O resultado desta análise foi comparado com a estrutura 3D modelada de modo a corroborar os dados teóricos (modelagem) com os experimentais (dados de CD) e, garantir que a proteína de interesse foi utilizada nos ensaios.

Modelagem da espermedesina ovina.

A estrutura da espermedesina de touro (*Bos taurus*) depositada no PDB (ROMERO et al., 1997) (pdbid: 1sfp) foi utilizada como molde para modelagem da ovina, por ter maior identidade entre as sequências de aminoácidos. O processo de modelagem foi realizado utilizando o pacote de programas Modeller v9.14 (ESWAR et al., 2006). Foram gerados mil modelos da proteína na forma apo (livre) onde, os cinco melhores modelos foram escolhidos com base nos parâmetros internos de qualidade do programa Modeller (*score* do programa).

Destes cinco, o melhor foi escolhido com base na qualidade estereoquímica avaliada pelo programa Procheck (CCP4, 1994).

RESULTADOS

Purificação da proteína.

O método de purificação por cromatografia é uma ferramenta tradicional e bastante confiável para se obter proteínas isoladas. Devido a espermedesina ser a proteína mais abundante do plasma seminal, é possível obtê-la por este método com rendimento considerável. A fig. 1 mostra o padrão de eluição cromatográfica do plasma seminal de ovinos da raça Texel.

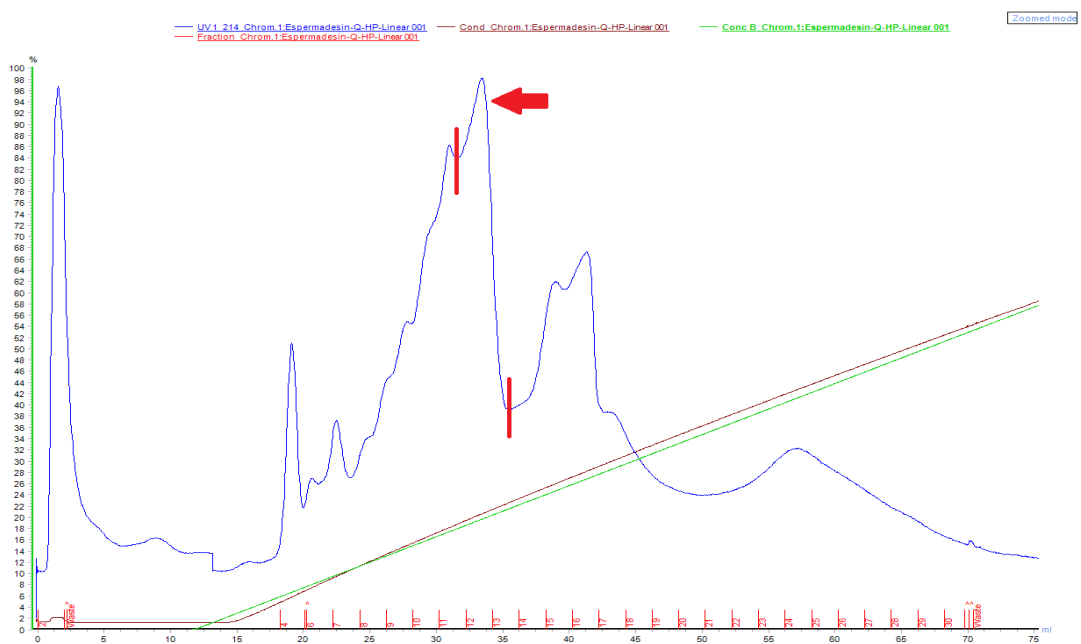


Figura 1. Perfil de eluição cromatográfica do plasma seminal de ovinos da raça Texel, destacando o pico contendo a fração com a espermedesina.

Após a coleta das frações a cada dois mLs, procedeu-se a identificação da espermedesina por meio de uma eletroforese SDS-PAGE corada com nitrato de prata (fig. 2). A espermedesina estava presente do quinto ao décimo poço, porém, bem concentrada nos poços seis e sete, os quais correspondem ao pico de eluição mostrado na fig. 1, sendo coletada nos tubos 11 e 12.

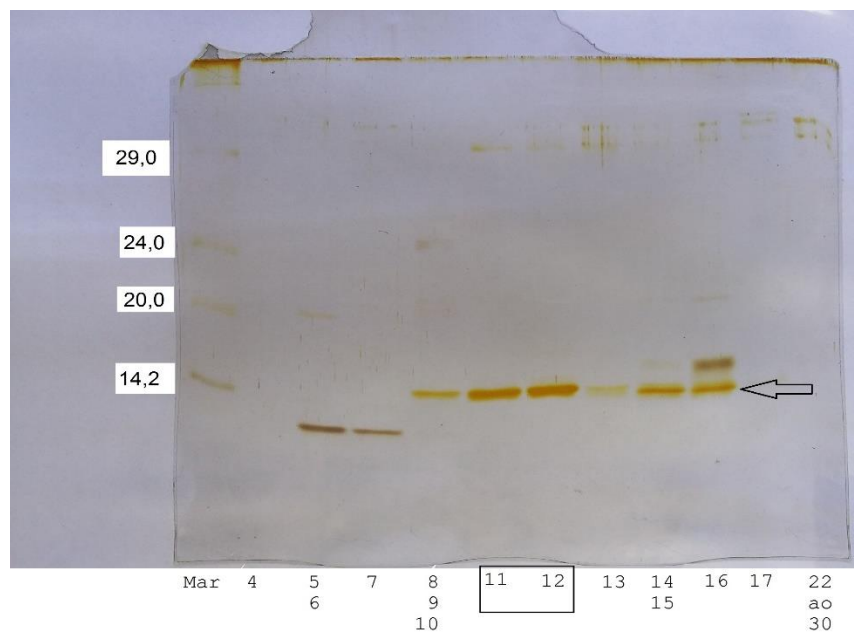


Figura 2. Gel de SDS-PAGE mostrando as frações com a espermedesina isolada, a qual apresenta peso molecular de 14 KDa.

A fig.3 apresenta os espectros de CD obtidos com a desnaturação térmica gradual da espermedesina nas condições citadas na metodologia.

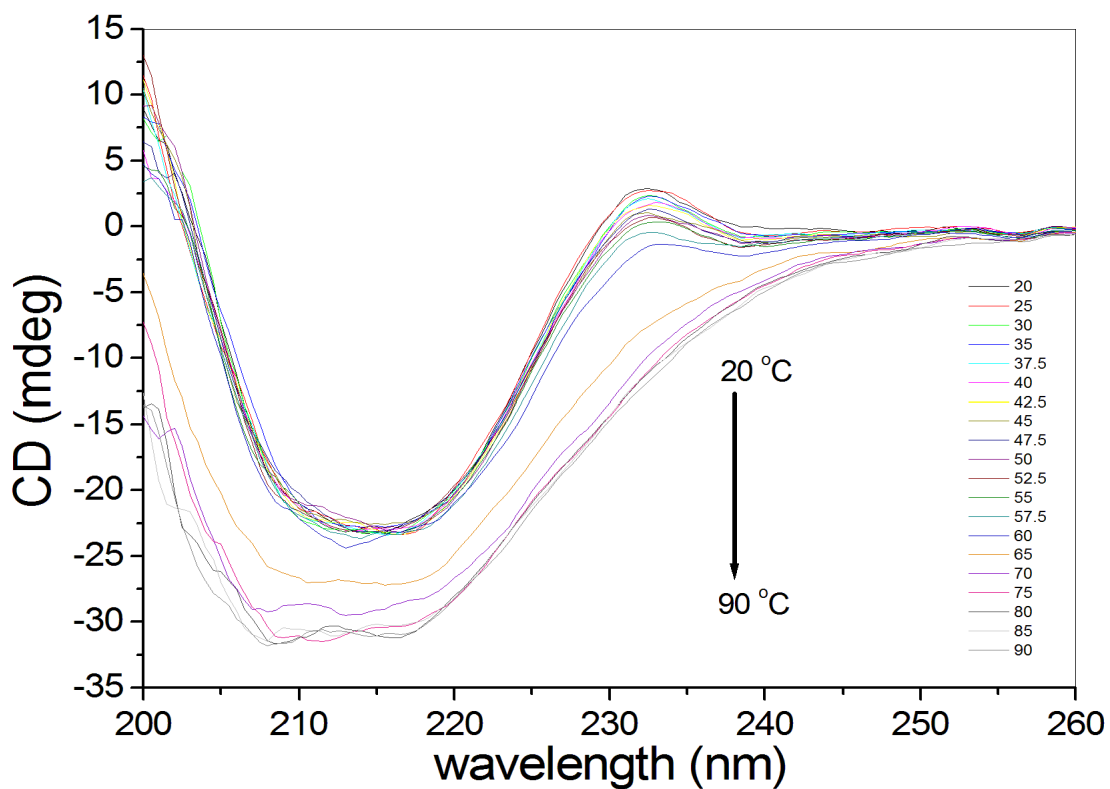


Figura 3. Variação do espectro de dicroísmo no UV em função do aquecimento.

A variação da elipicidade (CD) nos comprimentos de onda 210 e 210,5 nm foi graficada em função do aumento da temperatura (fig.4).

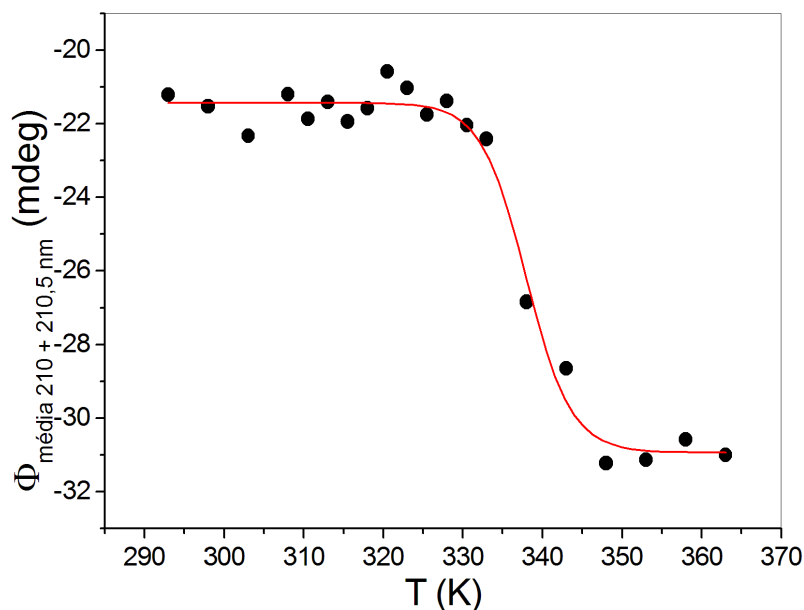


Figura 4. Variação da elipicidade média em 210 e 210,5 nm em função da temperatura. Para cada ponto experimental da fig. 3, foi calculado o ΔG em função da temperatura (fig. 5) de acordo com a equação 1, que correlaciona a f_D/f_N .

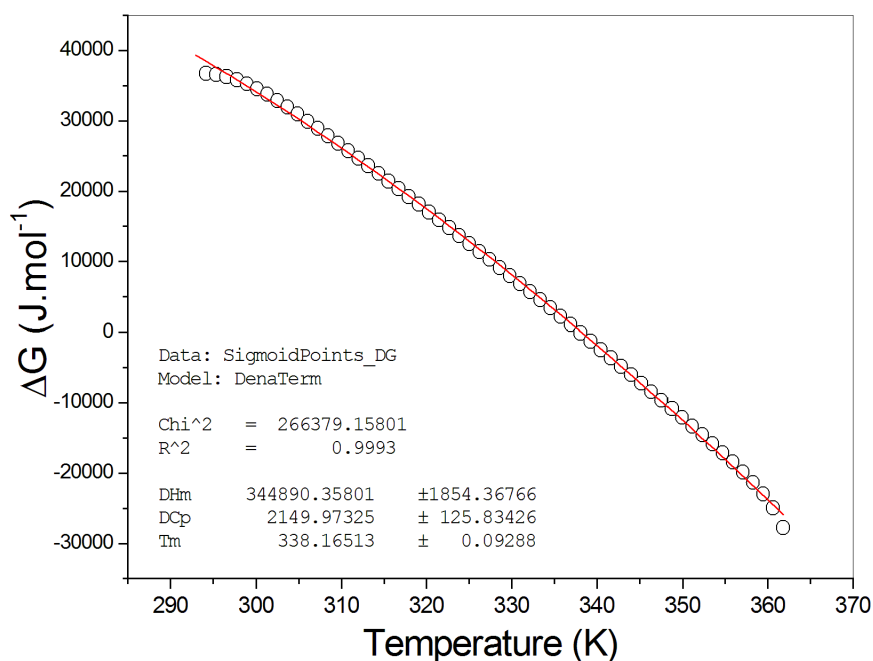


Figura 5. Variação do ΔG em função da temperatura (equação 1). A linha vermelha corresponde ao melhor ajuste da equação 2 aos pontos experimentais.

A equação 2 foi ajustada aos pontos experimentais da fig. 5. Assim, para que a equação se ajustasse bem aos pontos, os parâmetros T_m , ΔH_m e ΔC_p , teriam que assumir um dado valor, valores estes que são apresentados abaixo:

$$\begin{aligned}\Delta H_m &= 344,9 \text{ kJ/mol} \quad (\pm 1,85) \\ \Delta C_p &= 2,2 \text{ kJ/mol.K} \quad (\pm 0,13) \\ T_m &= 338,2 \text{ K ou } 65,2 \text{ }^\circ\text{C} \quad (\pm 0,09)\end{aligned}$$

Outra informação importante que é possível extrair a partir do espectro de CD em condições não desnaturantes (20 °C) é a composição da proteína em termos de elementos de estrutura secundária. Para isso, o espectro coletado a 20 °C foi analisado pelo programa CDNN, o qual confirmou que a folha beta é o componente majoritário do espectro.

Detalhes da deconvolução do espectro de CD e a comparação de seus resultados com o modelo teórico e com dados semelhantes de espermedesina de bode são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Comparação da porcentagem de elementos de estrutura secundária observados na proteína purificada a partir da espectroscopia de CD, com a porcentagem encontrada na estrutura modelada e a porcentagem observada na espermedesina recombinante de bode.

Elemento de estrutura	CDNN % (média 3 últimas colunas)	Estrutura modelada VADAR Server %	Espermedesina recombinante de Bode (<i>Capra hircus</i>)*
Hélice	3,4	2,0	3,0
Folha-β	50,6	68,0	46,0
Beta turn	19,0	14,0	31,0
Coil	34,9	28,0	20,0
Total	107,9	112,0	100,0

* (Nascimento et al., 2012)

Os resultados mostrados na tabela 1, indicam que a composição secundária da espermedesina ovina estimada a partir de dados experimentais (espectro de CD) coincide com o que é observado na estrutura modelada 3D (dados adiante). Além disso, a composição secundária da espermedesina ovina está de acordo com o observado na literatura (Nascimento et al., 2012) que mostra que na espermedesina recombinante de bode (*Capra hircus*) apresenta folha-β

(46%) como sendo o componente predominante sobre os outros elementos que incluem α -hélices (3%), voltas (31%) e elementos desordenados (20%).

Modelagem por homologia da estrutura 3D da espermedesina.

A sequência de aminoácidos da espermedesina de *Ovis aries* foi obtida na base de dados Uniprot (uniprot id: w5pek8). A partir dela, foi realizado um BlastP contra a base de dados PDB para a busca de moldes estruturais. Os resultados mostraram que a espermedesina de touro (*Bos taurus*) possui 79% de identidade com a espermedesina ovina.

O melhor modelo da espermedesina ovina selecionado dentre os 1000 modelos gerados pelo programa Modeller está representado na fig. 6.

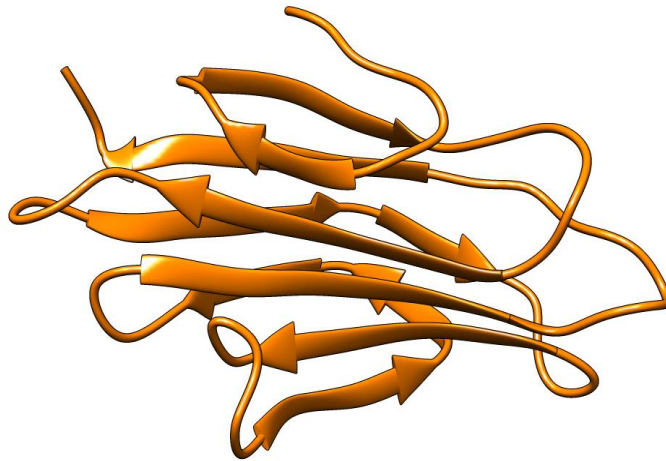


Figura 6. Estrutura em fita representando o modelo gerado da espermedesina ovina. Destacam-se os elementos de estrutura secundária como folhas- β e as alças e voltas (elementos desordenados).

O modelo 3D da espermedesina ovina, pôde então ser utilizado para comparação de seus elementos de estrutura secundária com o que foi observado a partir de dados experimentais de espectroscopia de dicroísmo circular. O fato de o modelo teórico estar em concordância com os dados experimentais de espectroscopia confirma que a proteína isolada por cromatografia é de fato a proteína de interesse neste estudo.

DISCUSSÃO

A sequência de aminoácidos da espermedesina ovina possui 135 resíduos de aminoácidos, sendo que os resíduos de 1 a 20 remetem a um peptídeo de sinalização para a via secretora (meio extracelular). Já os resíduos de 21 a 135 correspondem a espermedesina propriamente dita. A análise dos resíduos que compõe a estrutura da espermedesina ovina pelos servidores NetOGlyc 4.0 (STEENTOFT et al, 2013) e GlycoEP (CHAUHAN et al, 2013) indicaram que

não há sítios de glicosilação na proteína, portanto, muito provavelmente trata-se de uma proteína não glicosilada.

Existem apenas três estruturas de espermedesinas depositadas no PDB, sendo uma de touro (*Bos taurus*, pdbid: 1sfp) e duas de suíno, chamadas de PSP-I e PSP-II (*Sus scrofa*, pdbid: 1spp) (ROMERO et al, 1997) onde, a PSP-I e PSP-II são glicosiladas em sítios diferentes (resíduo 71 na PSP-I e resíduo 119 na PSP-II).

A espermedesina de carneiro da raça Texel possui uma estrutura tridimensional semelhante às demais espermedesinas depositadas no PDB. Ao compararmos a porcentagem de elementos de estrutura secundária da espermedesina obtida por modelagem com a porcentagem fornecida pela espectroscopia de CD, observamos que a quantidade de alfa-helices e folhas-beta são muito parecidas (tabela 1). A maior diferença está na porcentagem de elementos desordenados, sendo 34,9% na estrutura purificada (CD) e um pouco menor 28,0% na estrutura modelada. Esta diferença é justificada, pois, na estrutura modelada estão faltando os três primeiros resíduos de aminoácido que, muito provavelmente assumem uma conformação desordenada. Se acrescentássemos estes resíduos desordenados a estrutura modelada, estimamos que a porcentagem deste elemento seria muito mais semelhante aquela encontrada na proteína isolada.

Tabela 2. Comparação dos elementos de estrutura secundária das estruturas 3D das espermedesinas, por meio do servidor VADAR.

Elemento de estrutura	<i>Ovis aries</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa (PSP-I)</i>	<i>Sus scrofa (PSP-II)</i>
Hélice- α	2,0	0,0	0,0	0,0
Folha- β	68,0	68,0	69,0	66,0
Beta turn	14,0	14,0	14,0	14,0
Coil	28,0	31,0	30,0	33,0
Total	112,0	113,0	113,0	113,0

Apesar do enovelamento muito parecido destas quatro proteínas (fig.8 A, B, C), a identidade entre elas é de apenas 22,2%. Filogeneticamente, a espermedesina ovina é muito mais próxima da de touro (fig. 7), por isso, sua maior identidade (78,3%). Além disso, a espermedesina de touro não possui sítio de glicosilação, assim como a de carneiro, ao passo que as espermedesinas de suíno, são ambas glicosiladas em sítios diferentes.

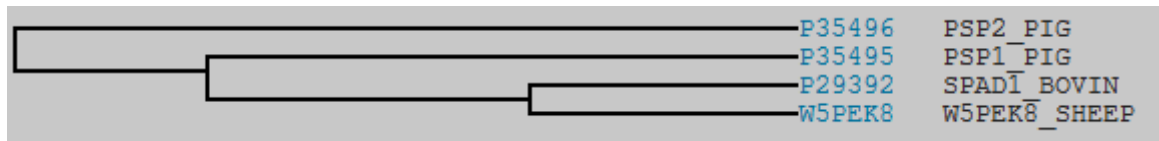


Figura 7. Cladograma mostrando a relação filogenética entre as estruturas de espermedesina de suíno, touro e de carneiro.

A fig. 8 mostra a sobreposição das estruturas cristalográficas das espermedesinas de touro, suíno e carneiro (modelada). As espermedesinas de suíno (fig. 8 D) apresentam maior variabilidade estrutural entre si, compartilhando uma identidade de apenas 37,1%. Contudo, Romero et al. (1997) descrevem que as espermedesinas PSP-I e PSP-II estariam associadas formando um heterodímero em sua unidade funcional (unidade biológica) no plasma seminal.

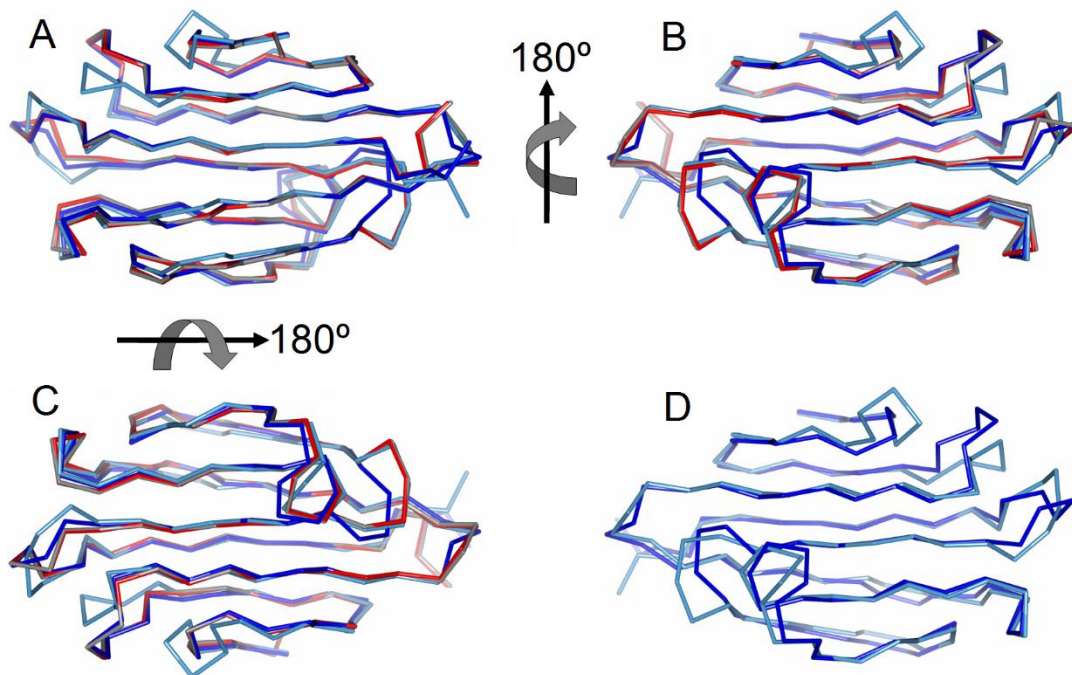


Figura 8. Sobreposição das estruturas das espermedesinas de Carneiro (vermelho), Touro (cinza), Suíno PSP-I (azul escuro) e Suíno PSP-II (azul claro).

Em relação as suas propriedades biofísicas, a espermedesina ovina se desenovela com uma T_m de 338,2 K (65,2 °C). Isso significa que esta proteína consegue suportar altas temperaturas sem se desenovelar, conservando suas propriedades. Essas propriedades teriam um efeito importante na manutenção integridade do esperma em condições adversas, como por exemplo, nas temperaturas mais altas do trato genital feminino em relação ao epidídimo, onde os espermatozóides ficam armazenados. A alta T_m se deve a presença de duas pontes

dissulfeto entre os resíduos de cisteína 7 com 28 e, 51 com 72, o que foi confirmado na estrutura modelada. Pontes dissulfeto são ligações covalentes entre resíduos de aminoácidos cisteína, portanto, é necessária uma alta energia fornecida por altas temperaturas para rompê-las (LEHNINGER, et al., 2000).

Devido ao baixo volume de ejaculado dos caprinos e conseqüentemente baixa obtenção de espermedesina, Nascimento et al., (2012) realizaram a produção de espermedesina recombinante de bode (rBdh-2His), e posteriormente realizaram a purificação e análises de CD dessa proteína. No seu experimento de CD, cada espectro foi coletado em uma temperatura distinta entre 5°C até 55°C em intervalos de 5°C, onde os resultados mostraram que a espermedesina recombinante de bode se desnatura a uma temperatura de 42°C. Estes autores reportam que, por se tratar de uma proteína recombinante, a rBdh-2His tem uma estabilidade térmica menor quando comparada com outras espermedesinas nativas, tais como as de suíno SFP, PSP-I, e PSP-II.

CONCLUSÃO

A espermedesina, o componente protéico mais abundante do plasma seminal de ovinos da raça Texel foi isolada com sucesso pelo protocolo estabelecido. O alto valor de T_m em relação à média de outras proteínas, indica que a espermedesina suporta temperaturas mais altas sem se desenovelar. Valores positivos de ΔH_m indicam que nas condições analisadas (até 65,2 °C) o estado nativo é favorecido em relação ao estado desenovelado, garantindo estabilidade estrutural a proteína. Junta estas informações permitem concluir que a espermedesina pode ter um papel importante na manutenção da viabilidade dos espermatozoides em ambientes com temperatura mais elevada em relação ao epidídimo, como por exemplo, no interior do trato genital feminino.

REFERÊNCIAS

- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**. v.71. p.461-470. 2005.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J. M.; GARCÍA, E. M.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MARTÍNEZ, E. A. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**. v.70. p.1352-1355. 2008.

CALVETE, J.J.; MANNK, S. W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAID, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: Effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemistry Journal**. v.310. p.615-622. 1995.

CARDOZO, J. A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUINO-BLANCO, T. CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**. v. 66. p.841-850. 2006.

CCP4 - Collaborative Computational Project. A suite CCP4: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica. Section D**, biological crystallography, v. 50, n. 5, p. 760, 1994.

CHAUHAN, J. S.; RAO, A, RAGHAVA. In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in **Eukaryotic Protein Sequences**. PLoS ONE. 2013.

ESWAR, N.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.Y.; PIEPER, U.; SALLI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Curr Protoc Bioinformatics**, Chapter 5: Unit 5 6, 2006.

HAASE, B.; SCHLOTTERER, C.; HUNDRIESER, M. E.; KUIPER, H.; DISTL, O.; TOPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. et al. Evolution of the spermdhesin gene family. **Gene**. v.352. p.20-29. 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.227. p.680-685. 1970.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, p.839. 2000.

ROMÃO, M. J.; KOLLN, I.; DIAS, J. M.; CARVALHO, A. L.; ROMERO, A.; VARELA, P. F.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: a bovine polypeptide of the Spermadhesin Family. **Journal of Molecular Biology**. v.274. p.650-660. 1997.

ROMERO, A., ROMAO, M.J., VARELA, P.F., KOLLN, I., DIAS, J.M., CARVALHO, A.L., SANZ, L., TOPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structure Biology**. v.4. p.783-788, 1997.

STEENTOFT, C.; VAKHRUSHEV, S. Y.; JOSHI, H. J.; KONG, Y. VESTER-CHRISTENSEN, M. B.; SCHJOLDAGER, K. T.; LAVRSEN, K.; DABELSTEEN, S. PEDERSEN, N.B.; MARCOS-SILVA, L.; GUPTA, R.; BENNETT, E. P.; MANDEL, U.; BRUNAK, S.; WANDALL, H. H.; LEVERY, S. B.; CLAUSEN, H. EMBO, J. 32(10):1478-88, May 15, 2013.

VARELA, P. F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMÃO, M. J.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The 2.4 Å Resolution crystal structure of boar seminal plasma PSPI/PSPII: A zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **Journal of Molecular Biology**. v.274. p.635-649. 1997.

8.7 Certificado do Comitê de Ética de Pesquisa com Animais



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOFÍSICA DA PROTEÍNA ESPERMADÉSINA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS", protocolada sob o CEUA nº 2253120516, sob a responsabilidade de Antonio Campanha Martínez e equipe; Manoel Augusto Klemповus Villela Condessa; Stella Maris Teobaldo Tironi - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 02/06/2016.

We certify that the proposal "PURIFICATION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF SPERMADHESIN PROTEIN IN SEMINAL PLASMA SHEEP", utilizing 4 Ovines (4 males), protocol number CEUA 2253120516, under the responsibility of Antonio Campanha Martínez and team; Manoel Augusto Klemповus Villela Condessa; Stella Maris Teobaldo Tironi - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 06/02/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2016** a **07/2018** Área: **Bioquímica**

Origem: **Animais provenientes de outro projeto**

Espécie: **Ovinos** sexo: **Machos** idade: **18 a 60 meses** N: **4**

Linhagem: **Texel / santa ines** Peso: **50 a 100 kg**

Resumo: A inseminação artificial é uma ferramenta importante para o desenvolvimento da pecuária, pois essa técnica permite o uso de reprodutores selecionados, com características genéticas superiores, no entanto para seu melhor aproveitamento na ovinocultura ainda são necessários muitos avanços, principalmente na qualidade do sêmen refrigerado e criopreservado. Com isso a necessidade de desenvolver técnicas e estudos para garantir a qualidade dos espermatozoides, fazendo o uso de proteínas presentes no plasma seminal desses animais, obtendo assim resultados mais satisfatórios. Entre essas proteínas destacam-se as pertencentes à família das espermadesinas, proteínas de baixo peso molecular (12 a 16 kDa) secretadas pelo trato genital masculino e glândulas anexas, ligadas a superfície dos espermatozoides e representam as principais proteínas encontradas no plasma seminal de algumas espécies. Não há relatos na literatura descrevendo os efeitos desta proteína no plasma seminal ovino, portanto, este trabalho visa descrever pela primeira vez as características estruturais e biofísicas desta proteína de ovinos da raça Texel. Para isto será realizado a coleta de sêmen de dois carneiros da raça Texel utilizando a técnica de eletroejaculação e imediatamente separar o plasma seminal por meio de centrifugação, para que seja possível purificar a espermadesina ovina utilizando técnicas de cromatografia em coluna e posteriormente avaliar a pureza da amostra por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em sequência realizar estudos de desnaturação da espermadesina em um espectropolarímetro de dióidismo circular e correlacionar os dados obtidos com a estrutura tridimensional obtida através de modelagem por homologia.

Local do experimento: Campus Regional de Umuarama: Laboratório de Criação e Reprodução Animal e Laboratório de Bioquímica Estrutural. Campus Sede: Comcap, Central de Produtos Naturais

Maringá, 02 de dezembro de 2016

Prof. Dra. Vilma Aparecida Ferreira de Godoi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá