

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO
PLASMA SEMINAL BOVINO OSTEOPONTINA E PROTEÍNA
ÁCIDA DO FLUIDO SEMINAL RELACIONADAS À ALTA
CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

IVAN CUNHA BUSTAMANTE FILHO
Médico Veterinário/UENF

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do
Grau de Doutor em Zootecnia
Área de Concentração Produção Animal

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus pais, por me ensinarem o valor da educação.

À Ana, por simplesmente tudo.

Agradecimentos

À Professora Maria Inês Mascarenhas Jobim, pela orientação e amizade, e por apostar na execução deste projeto, sempre me estimulando a continuar mesmo nas épocas de “resultados magros”.

À Professora Elizabeth Obino Cirne Lima, pela co-orientação e disponibilização das condições e oportunidades para a realização deste trabalho.

Ao Professor Jomar Pereira Laurino, por ter “abraçado a causa” numa época turbulenta, pelas horas juntos na bancada e inúmeras discussões sobre experimentos e protocolos, mesmo de longe.

Ao Doutor Marlon Schneider, por oportunizar meu estágio sanduíche em Munique e pela colaboração.

Aos colegas de bancada no Centro de Pesquisas do HCPA, Gabrielle, Fernanda, Aninha, Paula, Ana Ayala, Álvaro, Rafael, Jefferson, Flavinha, Nelson, pessoas que tornavam o dia mais leve e alegre. Vocês foram muito importantes.

À Luciana Meirelles Richer, que me ajudou muito durante a fase de purificação das proteínas, enviando, inclusive, reagentes e colunas dos EUA.

Aos demais colegas do Centro de Pesquisas do HCPA, afinal foram tantos laboratórios que tive a oportunidade de colaborar, trocar reagentes, ou simplesmente fazer um happy hour. Foi um prazer conhecê-los.

Aos amigos do Genzentrum na Ludwig-Maximilians Universität München Steffen, Sepp, Lúcio, Max, Izabel e Fabian por terem me acolhido tão bem e ajudado a tornar o período em Munique o mais prazeroso possível.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica da UFRGS, e Laboratório de Inseminação Artificial e Reprolab pela amizade e ajuda nestes quatro anos. Em especial agradeço aos professores Rodrigo, Eduardo, Adriana e Sandra por todo auxílio que deram em vários momentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em especial o Professor Alexandre de Mello Kessler, pelo apoio dado para a realização desta tese.

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado, à CAPES e ao DAAD pela bolsa sanduíche.

Ao CNPq, FAPERGS e FIPE pelo apoio financeiro.

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL BOVINO OSTEOPONTINA E PROTEÍNA ÁCIDA DO FLUIDO SEMINAL RELACIONADAS À ALTA CONGELABILIDADE DO SÊMEN¹

Autor: Ivan Cunha Bustamante Filho

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Inês Mascarenhas Jobim

Co-orientador: Prof. Dr^a. Elizabeth Obino Cirne Lima

O uso da tecnologia de DNA recombinante abre portas para um estudo detalhado da estrutura e função de proteínas, e a produção de proteínas recombinantes em sistema procaríoto apresenta várias vantagens. A presente tese propõe a expressão heteróloga das proteínas aSFP, proteína ácida do fluido seminal bovino de 14 kDa, e osteopontina (OPN) de 55 kDa, relacionadas à congelabilidade do sêmen. Foram construídas bibliotecas de cDNA de vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral. Oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados baseados nas seqüências disponíveis no GenBank (aSFP: número de acesso NM_174616, OPN: número de acesso M66236). Os amplicons resultantes das reações de PCR foram clonados em pET23a(+). Os plasmídios pET-aSFP e pET-OPN foram transformados em linhagens eletrocompetentes de *E. coli* BL21, BL21 (DE3), BL21 Star, BL21 Codon Plus e BL21 pLysS. Para expressão das proteínas recombinantes foram testadas diferentes concentrações de indutor de expressão IPTG, e diferentes tempos e temperaturas de indução. A expressão recombinante foi avaliada por SDS-PAGE, usando como controle cultivo não induzido. Das cinco linhagens transformadas com pET-aSFP, somente *E. coli* BL21 pLysS induzida com 0,5 mM de IPTG por 3 horas a 37°C apresentou uma banda de aproximadamente 15 kDa, compatível com o tamanho esperado de aSFP_r-6xHis. Por cromatografia de afinidade com metal imobilizado em condições desnaturantes foi possível um rendimento de purificação de 2,5mg/mL de aSFP_r-6xHis por 10 mL de cultura bacteriana. Contudo, a expressão de OPN_r-6xHis, também obtida com a linhagem de *E. coli* BL21 pLysS, foi de baixa eficiência, o que não permitiu sua purificação. A produção recombinante de proteínas do plasma seminal é uma das mais novas ferramentas para o estudo de suas funções. O aperfeiçoamento dos processos de expressão e purificação é fundamental no desenvolvimento desta biotecnologia, que possui grande potencial terapêutico e diagnóstico.

¹ Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (114 p.). Fevereiro de 2010.

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF THE PROTEINS FROM BOVINE SEMINAL PLASMA OSTEOPONTIN AND ACIDIC SEMINAL FLUID PROTEIN RELATED WITH SEMEN FREEZABILITY¹

Author: Ivan Cunha Bustamante Filho

Adviser: Prof. Dr Maria Inês Mascarenhas Jobim

Co-Adviser: Dr^a. Elizabeth Obino Cirne Lima

The use of recombinant DNA technology makes possible a deeper investigation on protein structure and function. Also the production of recombinant proteins has several advantages. The present thesis presents the recombinant expression of the 14 kDa acidic seminal fluid protein (aSFP) and osteopontin (55 kDa), both associated with bovine semen freezability. cDNA libraries from prostate, seminal vesicle and bulbourethral gland were constructed, and primers were designed based on data available on Genbank (aSFP: access number NM_174616; OPN: access number M66236). Amplicons of the target genes were cloned into pET23a(+), and the constructs pET-aSFP and pET-OPN were transformed into electrocompetent *E. coli* strains: BL21, BL21 (DE3), BL21 Star, BL21 Codon Plus e BL21 pLysS. For the expression trials, different concentrations of IPTG were tested, as well several different expression induction conditions. The recombinant expression was analyzed by SDS-PAGE and western blotting. The best expression for aSFP_r-6xHis (15 kDa) was obtained with the strain BL21 pLysS, induced with 0.5 mM IPTG in 3 hours at 37°C. The target protein was purified by immobilized metal ion chromatography in denaturing conditions with a yield of 2.5 mg/mL per 10 mL of bacterial culture. The recombinant expression of OPN_r-6xHis was also possible with the pLysS strain, however in a lower efficiency. The low amount of recombinant OPN did not allow its purification. The production of seminal plasma recombinant proteins is a new tool for the study of its functions. The improvement of expression and purification processes is important for this biotechnology which has a great potential for therapeutic and diagnose applications.

¹ Doctor of Science Thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (114 p.). February, 2010.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 O espermatozóide	4
2.2 O Plasma seminal	6
2.3 A Proteômica do plasma seminal bovino	9
2.3.1 Osteopontina (OPN)	11
2.3.2 Proteína Ácida do Plasma Seminal Bovino (aSFP)	16
2.4 Criopreservação do sêmen bovino	20
2.4.1 Efeitos da criopreservação no espermatozóide	21
2.5 Produção de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Criação de Biblioteca de cDNA	28
3.1.1 Isolamento de RNA	28
3.1.2 Digestão do DNA contaminante no isolado de RNA	29
3.1.3 Síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR)	30
3.2 Obtenção das seqüências das proteínas aSFP e OPN e escolha do vetor de expressão	30
3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
3.3 Clonagem intermediária em vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	34
3.4 Análise da eficiência da ligação dos insertos no vetor TOPO	35
3.4.1 Transformação de linhagem de <i>E. coli</i> TOP10 [®]	35
3.4.2 Extração de DNA plasmidial de bactéria usando <i>kit</i> comercial	37
3.4.3 Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose	37
3.5 Construção dos plasmídeos pET-aSFP e pET-OPN	38
3.5.1 Preparação dos insertos	38
3.5.2 Preparação do vetor de expressão pET23a(+)	39
3.5.3 Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose	39
3.5.4 Ligação dos insertos no pET23a(+)	40
3.5.5 Seqüenciamento das construções	41
3.6 Expressão de aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis em <i>E. coli</i>	42
3.6.1 Linhagens de <i>E. Coli</i> para expressão de proteínas recombinantes.....	42
3.6.2 Transformação das linhagens para expressão de proteínas recombinantes.....	43
3.6.3 Expressão das proteínas recombinantes aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis em pequena escala	43
3.6.4 Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida	43
SDS-PAGE	45
3.6.5 Análise da expressão das proteínas recombinantes	46

3.6.6 Otimização das condições de cultivo e expressão	48
3.7 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade	49
3.7.1 Lise bacteriana e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes	49
3.7.2 Purificação em pequena escala	50
3.7.2.1 Protocolo de purificação nativa	50
3.7.2.2 Protocolo de purificação desnaturante	51
3.7.2.3 Protocolo de purificação híbrida	51
3.7.3 Purificação em maior escala	52
3.8 Análise e simulação de experimentos <i>in sílica</i>	52
4. RESULTADOS	57
4.1 Criação da biblioteca de cDNA	57
4.2 Obtenção dos genes codificadores das proteínas aSFP e OPN ...	57
4.3 Clonagem em vetor pCR [®] 2.1-TOPO	59
4.4 Construção dos plasmídeos pET-aSFP e pET-OPN	59
4.5 Testes de expressão de aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis	66
4.5.1 Linhagens de <i>E.coli</i> que não expressaram aSFP r -6xHis.	66
4.5.2 Expressão de aSFP r -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS.	67
4.5.3 Linhagens de <i>E. coli</i> que não expressaram OPN r -6xHis..	69
4.5.4 Expressão de OPN r -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS	71
4.6 Purificação das proteínas aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis	73
4.6.1 Purificação da aSFP r -6xHis por cromatografia por afinidade	73
4.6.2 Purificação da OPN r -6xHis por cromatografia por afinidade	79
5. DISCUSSÃO	84
5.1 Uso de sistema eucarioto para expressão recombinante	85
5.2 A opção pelo vetor pET23a(+).....	87
5.3 Expressão insolúvel de aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis	88
5.4 Purificação por cromatografia de afinidade	93
6. CONCLUSÕES	97
7. PERSPECTIVAS	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
9. VITA	117

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen.....	12
TABELA 2 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados na amplificação das seqüências codificantes para as proteínas aSFP e OPN.....	32
TABELA 3 – Descrição do genótipo da linhagens <i>E. coli</i> TOP10 e JM-109....	36
TABELA 4 – Reação de retirada do inserto clonado no vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	40
TABELA 5 – Reação clivagem do vetor pET23a(+).	40
TABELA 6 – Primers utilizados na avaliação dos clones e seqüenciamento..	41
TABELA 7 – Linhagens de <i>E. coli</i> para expressão de proteínas recombinantes.....	47

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Ultraestrutura do espermatozóide de mamífero por microscopia eletrônica de transmissão	7
FIGURA 2 – Modelo para a interação entre a OPN, as integrinas e CD44 presentes nas membranas plasmáticas dos gametas masculinos e femininos	16
FIGURA 3 – Representação da estrutura da aSFP	18
FIGURA 4 – Seqüência do cDNA de aSFP bovina	31
FIGURA 5 – Seqüência do cDNA de OPN bovina	32
FIGURA 6 – Representação esquemática do plasmídeo pET23a(+)	33
FIGURA 7 – Representação esquemática da seqüência do sítio de clonagem múltipla do vetor pET23a(+)	33
FIGURA 8 – Representação esquemática do plasmídeo pCR [®] 2.1-TOPO	35
FIGURA 9 - Cuba de eletroforese para gel de agarose	38
FIGURA 10 – Eletroporador GenePulser XCell [®]	44
FIGURA 11 – Sistema de Eletroforese de gel de poliacrilamida	46
FIGURA 12 – Eletrotransferência (<i>western-blotting</i>)	48
FIGURA 13 – Tela da área de trabalho do software CLC Sequence Viewer	53
FIGURA 14 – Tela da área de trabalho do software pDRAW32 1.0	54
FIGURA 15 – Tela da área de trabalho do software Chromas 2.33	54
FIGURA 16 – Tela da área de trabalho do software online BLAST	55
FIGURA 17 – Tela da área de trabalho do software online Primer3Plus	55
FIGURA 18 – Tela da área de trabalho do software online IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1	56
FIGURA 19 – Amplificação do cDNA para β -actina para confirmação da criação de biblioteca de cDNA	58
FIGURA 20 - Produtos de PCR dos cDNA para aSFP e OPN	58
FIGURA 21 – Análise do vetor pTOPO-aSFP	60
FIGURA 22 – Análise do vetor pTOPO-OPN	61
FIGURA 23 – Clivagem dos clones A7 (pTOPO-aSFP) e O3 (pTOPO-OPN)	62
FIGURA 24 – Análise dos clones resultantes da clonagem dos genes em pET	63
FIGURA 25 – Análise de restrição e PCR de clones recombinantes	63
FIGURA 26 – Representação esquemática do plasmídeo pET-aSFP	64
FIGURA 27 – Representação esquemática do plasmídeo pET-OPN	65
FIGURA 28 – Teste de expressão de aSFP r -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 DE3	66
FIGURA 29 – Teste de expressão de aSFP r -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 SI induzida com 300 mM de NaCl	67
FIGURA 30 – Teste de expressão de aSFP r -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 SI induzida com 200 mM de NaCl	67
FIGURA 31 – Expressão da aSFP r -6xHis em <i>E. coli</i> pLysS	68
FIGURA 32 – Imunoidentificação de aSFP r -6xHis	69

FIGURA 33 – Teste de expressão de OPN <i>r</i> -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 DE3.	70
FIGURA 34 – Teste de expressão de OPN <i>r</i> -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 Codon Plus	70
FIGURA 35 – Teste de expressão de OPN <i>r</i> -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 Star	71
FIGURA 36 – Teste de expressão de OPN <i>r</i> -6xHis em <i>E. coli</i> BL21 pLysS	72
FIGURA 37 – Imunoidentificação de OPN <i>r</i> -6xHis e avaliação da solubilidade da proteína	72
FIGURA 38 – Purificação da fração solúvel de aSFPr-6xHis em condições nativas	75
FIGURA 39 – Purificação da fração insolúvel de aSFPr-6xHis em condições híbridas	76
FIGURA 40 – Purificação da fração insolúvel de em condições desnaturantes	77
FIGURA 41 – Otimização da purificação da fração insolúvel de em condições desnaturantes	78
Figura 42 – Perfil eletroforético do pool das frações de eluição concentrado	79
FIGURA 43 – Purificação da fração solúvel de OPN-6xHis em condições nativas com 150 µL de resina	80
FIGURA 44 - Purificação da fração solúvel de OPN <i>r</i> -6xHis em condições nativas	81
FIGURA 45 – Purificação da fração solúvel de OPN-6xHis em condições nativas com 1 mL de resina	83

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μF	microFaraday
aSFP	Proteína ácida do fluido seminal
BSA	Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
BSP	Bovine seminal plasma protein (proteína do plasma seminal bovino)
BSPHI	Binding Sperm Protein Human I
cDNA	DNA complementar
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Fosfatase alcalina de intestino de bezerro)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonuclêico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EtBr	Brometo de etídio
HIS-Tag	Etiqueta de polihistidina
IMAC	Imobilized metal affinity cromatography (cromatografia de afinidade com metal imobilizado)
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
mtDNA	DNA mitocondrial
MW	Molecular weight (peso molecular)
mΩ	miliohms
OPN	Osteopontina
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonuclêico
ROS	Reactiv oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com transcriptase reversa
SDS	Sódio dodecil sulfato
SPMI	Inibidor de motilidade do plasma seminal
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TrxA	Etiqueta de tireodoxina
X-gal	Bromo-cloro-indolil-galactopiranosídeo

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho bovino da ordem de 200 milhões de cabeças, resultando na produção de mais de sete milhões de toneladas de carne, sendo que destas, mais de seiscentas mil foram exportadas em 2004; números que colocam o Brasil como o maior exportador mundial de carne bovina (Brasil, 2005). Apesar das divisas alcançadas por este setor que, comprovadamente, pesam na balança comercial brasileira, a produtividade da bovinocultura nacional está aquém do seu real potencial, o que torna imprescindível e prioritário seu aumento para manutenção na liderança no contexto internacional.

Dentre os fatores que influenciam a baixa produtividade dos rebanhos, os relacionados à reprodução chamam a atenção devido ao seu alto impacto nos índices da produção. Analisando o efeito do macho na evolução do rebanho, podemos constatar a importância deste na dinâmica da criação. O touro é o agente principal na multiplicação do rebanho e no ganho genético, uma vez que, na monta natural, é capaz de servir um número significativo de vacas e que, através da inseminação artificial, pode chegar de 10 a 15 mil

vacas por ano. Logo, selecionar reprodutores superiores quanto à qualidade, congelabilidade do sêmen e fertilidade é da maior relevância econômica.

A tecnologia da criopreservação do sêmen bovino apresenta desenvolvimento satisfatório, o que resulta num grande e crescente mercado onde, só no Brasil, foram comercializadas mais de oito milhões de doses em 2009 (Asbia, 2009). Entretanto, um dos pontos restritivos da inseminação artificial é a frequência com que são encontrados, em centrais de inseminação artificial, touros selecionados quanto aos aspectos produtivos, mas que mostram dificuldade para a criopreservação do material fecundante, apesar do quadro espermático normal quanto aos aspectos físicos e morfológicos.

Na década de 1950 surgiram os primeiros estudos sobre a composição protéica do plasma seminal bovino. Apesar das limitações tecnológicas, estes estudos bioquímicos abriram caminho para a investigação mais detalhada dos componentes do fluido seminal. Estudos do proteoma do plasma seminal bovino ainda estão em andamento e, com o conhecimento adquirido, novas informações foram obtidas a partir da comparação do fluido seminal com índices de fertilidade e congelabilidade do sêmen de touros. Estes estudos resultaram na detecção de prováveis marcadores protéicos de congelabilidade e fertilidade do sêmen. No que se refere à congelabilidade do sêmen foram sugeridas a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), a clusterina, a albumina e a osteopontina como possíveis marcadores.

Alguns trabalhos já evidenciaram os efeitos positivos da adição de proteínas do plasma seminal ao sêmen de mamíferos. Osteopontina purificada de leite bovino aumentou os índices de fertilização de ovócitos, a clivagem e o

desenvolvimento embrionário *in vitro*. A suplementação com aSFP purificada de plasma seminal reduziu a lipoperoxidação de membrana plasmática e aumentou a atividade mitocondrial dos espermatozoides. Entretanto, nenhum estudo avaliou o possível efeito ou função destas proteínas na criopreservação do sêmen. Especula-se que estas proteínas, além de indicadores de alta congelabilidade, possam ter um papel importante na preservação espermática. Com isso, a adição destas proteínas ao sêmen de touros de baixa congelabilidade pode representar uma alternativa para centrais de inseminação artificial que utilizam animais de elevado valor zootécnico, porém, muitas vezes com baixa produtividade do sêmen congelado para comercialização.

O uso destas proteínas produzidas pela tecnologia de DNA recombinante pode ser uma valiosa ferramenta para melhor compreensão de suas funções. Atualmente, esta tecnologia é amplamente usada pela indústria farmacêutica e biotecnológica na produção de hormônios, anticorpos e enzimas para os mais diversos fins. Contudo, a aplicação desta na pesquisa em andrologia é escassa, porém promissora. Sua aplicação além de ampliar as fronteiras da proteômica, abre portas para novas abordagens na otimização da criopreservação do sêmen.

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Construir vetores de DNA plasmidiais para a expressão recombinante das proteínas bovinas osteopontina e aSFP.
2. Expressar a forma recombinante das proteínas OPN e aSFP em *Escherichia coli*.
3. Purificar as proteínas recombinantes produzidas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 O espermatozóide

O espermatozóide é uma célula altamente especializada, tendo suas características morfológicas, ultraestruturais e bioquímicas adaptadas para a transmissão do genoma masculino. É uma célula formada especialmente para executar uma função: percorrer o trato reprodutivo feminino, mantendo-se apta a realizar a fecundação. Para desempenhar esta tarefa, o gameta masculino abre mão de grande parte de suas organelas, bem como de volume citoplasmático. O resultado é uma célula de excelente hidrodinâmica, com citoplasma quase inexistente, com o Golgi e as mitocôndrias remanescentes rearranjadas em pólos opostos e com o citoesqueleto adaptado para dar mobilidade ao espermatozóide em matriz líquida (Eddy, 2006).

Estruturalmente, o espermatozóide pode ser dividido morfológica e funcionalmente em duas partes: (i) cabeça e (ii) flagelo ou cauda. Descrevendo do exterior para o interior da célula, a cabeça do espermatozóide é composta, pela membrana plasmática, fundamental para a interação da célula com o

ambiente em que se encontra, seja no sistema reprodutivo masculino ou feminino. Esta interação é mediada por proteínas, peptídeos, ácidos graxos e colesterol, que atuarão como fatores capacitantes ou decapacitantes. Com isso, a membrana plasmática do espermatozóide sofre mudanças constantes em sua composição, pois funciona como interface entre a célula e o meio, sendo através dela, feitas as comunicações intercelulares (Eddy, 2006; Sutovsky & Manandhar, 2006).

Logo após a membrana plasmática encontra-se o acrossoma, resultante da reorganização do Golgi, onde se acumularam, ao final da espermatogênese, enzimas-chave para a penetração do espermatozóide no ovócito. Finalmente, temos o núcleo que abriga a cromatina altamente compactada. A ultracompactação da cromatina é obtida pela troca das histonas pelas protaminas, proteínas que permitem um maior grau de enovelamento da fita de DNA. Com isso, assume-se que não há expressão gênica no espermatozóide (Eddy, 2006; Sutovsky & Manandhar, 2006).

O flagelo ou cauda é composto por três regiões ou peças: A peça intermediária compreende a bainha mitocondrial e o axonema, eixo central da estrutura motora do espermatozóide. Aproximadamente 75 a 100 mitocôndrias são dispostas helicoidalmente, e são responsáveis pela produção de energia para o batimento flagelar da cauda. Cada mitocôndria carrega cópias de genoma mitocondrial (mtDNA) paterno, que podem ser transmitidas ao ovócito, porém acredita-se que esse seja degradado após a fertilização (Sutovsky & Manandhar, 2006). O axonema, formado com o rearranjo do citoesqueleto das células espermáticas primordiais, é disposto em 9 + 2 pares de microtúbulos

dispostos em paralelo. A peça principal e a peça final são constituídas pelo prolongamento do axonema, circundado pela bainha fibrosa (Eddy, 2006; Sutovsky & Manandhar, 2006). A figura 1 descreve em detalhes a morfologia do espermatozóide.

2.2 O Plasma seminal

O plasma seminal, fluido no qual os espermatozoides estão suspensos na ejaculação, fornece o meio de transporte espermático e apresenta diversos fatores essenciais na sobrevivência e manutenção do potencial fertilizante da célula espermática (Mann & Lutwak-Mann, 1981). Seu volume e composição variam muito entre as espécies, tendo influência direta das características anatomo-fisiológicas tanto do macho quanto da fêmea. Fatores como anatomia do útero e local de deposição do sêmen determinaram, evolutivamente, características seminais como volume, concentração e presença de gel (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

Uma enorme variedade de biomoléculas (proteínas, lipídios e glicídios) conferem ao plasma seminal uma complexa constituição. Esta abundância de biomoléculas é resultado de uma compensação devido à quase ausência de citoplasma no espermatozóide (Aitken & Baker, 2004). Funções realizadas comumente no citoplasma de células diplóides são perdidas durante a espermatogênese. Para compensar esta perda, as diversas secreções que compõem o plasma seminal contribuem com fatores necessários para a função e preservação espermática no meio extracelular. Esta compensação pode ser observada na alta atividade antioxidante apresentada pelo plasma seminal,

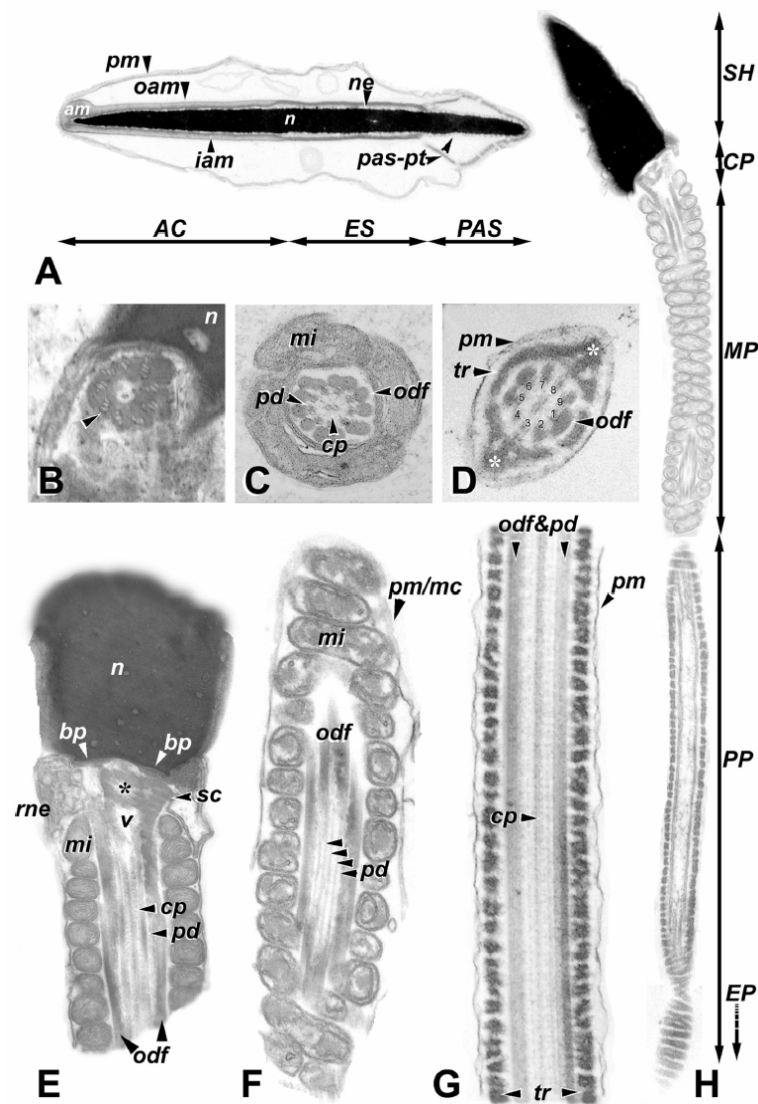


FIGURA 1 - Ultraestrutura do espermatozóide de mamífero por microscopia eletrônica de transmissão. A: Corte sagital da cabeça englobando as regiões do acrossomo (AC), segmento equatorial (ES) e bainha pós-acrossomal (PAS). Observa-se a cobertura da cabeça pela membrana plasmática (pm), estando mais internamente o acrossoma (am) delimitado pela membrana acrossômica externa (oam) e interna (iam). O grau de compactação e achatamento do núcleo (n) pode ser facilmente evidenciado. B–G: cortes transversais e longitudinais da cauda espermática nas regiões do colo (B, E), peça intermediária (C, F) e peça principal (D, G). Destacam-se em (E) as indicações das localizações das mitocôndrias (mi), em (C, E, G) a disposição do axonema, composto pelo par de microtúbulos centrais (cp) e nove pares de microtúbulos periféricos (pd). H: Estrutura geral do espermatozóide dividida em cinco partes principais: cabeça (SH), colo (CP), peça intermediária (MP), peça principal (PP) e peça final (EP). Adaptado de (Sutovsky & Manandhar, 2006).

atividade conferida por enzimas como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Estas enzimas normalmente são encontradas no citoplasma de células somáticas e têm reduzida atividade no espermatozóide, cabendo ao plasma seminal a função de proteção dos gametas contra as espécies reativas de oxigênio (De Laraminde & Gagnon, 1995).

Composto por secreções do testículo, epidídimo e das glândulas acessórias, o plasma seminal é rico em sais, macro e microelementos, açúcares e proteínas. Ao deixar o testículo, o espermatozóide passa através dos ductos eferentes ao epidídimo, onde glicerilfosforilcolina, carnitina e ácido siálico são encontrados em altas concentrações; são também elevadas as taxas de sódio e potássio, os principais cátions no plasma seminal dos mamíferos (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

Os outros componentes do plasma seminal provêm das ampolas, vesículas seminais e próstata. No touro, as ampolas secretam frutose e citrato. As vesículas seminais, que produzem 30-60% do volume total de sêmen ejaculado, possuem, dentre as glândulas acessórias, o conteúdo mais rico em proteínas, apresentando altas concentrações de frutose, contribuindo também na produção da maioria das prostaglandinas existentes no plasma seminal (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

A secreção da próstata é ácida e contém putrescina, espermidina e espermina; contribuindo também com diversos minerais. Grande parte da secreção prostática e vesicular é composta de enzimas freqüentemente associadas com a membrana plasmática. A secreção das glândulas bulbo-uretrais

é mais alcalina que a das outras glândulas acessórias, neutralizando, assim, o caráter ácido das demais (Miller & Ax, 1988).

2.3 A Proteômica do plasma seminal bovino

O plasma seminal possui importância fundamental na fertilização e, a cada dia, novas funções são apontadas. As primeiras abordagens bioquímicas do plasma seminal buscaram responder algumas dúvidas referentes a sua composição de sais e minerais (Kirton et al., 1964). A identificação dos componentes protéicos do ejaculado, através da técnica de eletroforese, vem sendo utilizada desde a década de 50 (Larson et al., 1954; Larson & Salisbury, 1954; Bennet, 1965; Banerjee & Ganguli, 1971), e os primeiros eletroferogramas em 1954 já mostravam o plasma seminal como uma complexa mistura de proteínas (Larson & Salisbury, 1954). Porém, à luz do conhecimento e domínio tecnológico da época, os autores foram limitados a identificar grupos de proteínas. Não foram encontrados padrões diferentes entre os animais comparados (Larson et al., 1954; Larson & Salisbury, 1954), contudo o pioneirismo dos autores mostrou que o plasma seminal poderia ser algo mais do que uma simples secreção das glândulas acessórias com a função de carrear os gametas masculinos.

Nas décadas seguintes, o estudo das proteínas presentes no plasma seminal desenvolveu-se principalmente a partir de resultados obtidos em pesquisas em outros sistemas e tecidos, isto é, com a descoberta de proteínas como albumina, imunoglobulinas, insulina e hormônios, que começaram a ser identificadas também no sêmen de mamíferos (Georgiev, 1978; Kemme et al.,

1984; Kemme et al., 1986; Manjunath et al., 1987; Seidah et al., 1987; Scheit et al., 1988; Miller et al., 1990).

O aperfeiçoamento dos métodos de estudo de proteínas permitiu novas formas de análise do conteúdo protéico do plasma seminal. Com isso, o limitado eletroferograma obtido em eletroforese em papel foi gradualmente substituído por outras matrizes como a de poliacrilamida (SDS-PAGE) e novas formas de separação também foram aplicadas. A separação das proteínas através da isoeletrofocalização permitiu uma nova perspectiva de análise do conteúdo de proteínas do plasma seminal (Georgiev, 1978). Com a associação destas duas técnicas, desenvolveu-se a eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (2D SDS-PAGE) (O'farrell & O'farrell, 1977), que permitiu um aumento na resolução da separação, facilitando a caracterização das proteínas. Através deste método, muitas proteínas do plasma seminal de várias espécies foram descritas e caracterizadas (Killian et al., 1993; Desnoyers et al., 1994; Frazer & Bucci, 1996; Frazer et al., 1996; Mortarino et al., 1998; Brandon et al., 1999; Moura et al., 2006a; Moura et al., 2006b).

Com um melhor poder de resolução, também foi possível comparar de forma mais eficiente os perfis protéicos entre grupos de animais. Assim, diversos trabalhos abordaram a correlação do plasma seminal com padrões de fertilidade normais (Ax et al., 1985; Nass et al., 1990) e alterados (Rocha et al., 1974; Wolfe et al., 1993), com a congelabilidade (Roncoletta et al., 1997; Roncoletta, 2000; Jobim et al., 2004) e com a viabilidade do sêmen (Aurich et al., 1996). Uma das principais contribuições destes trabalhos foram as indicações de determinadas

proteínas como possíveis marcadores de fertilidade e congelabilidade do sêmen bovino (Jobim et al., 2004; Moura et al., 2006b). O papel das proteínas do plasma seminal na criopreservação do sêmen vêm sendo aos poucos elucidado. O efeito crioprotetor da gema de ovo foi relacionado com a propriedade de ligação a LDL (lipoproteína de baixa densidade) apresentada pelas proteínas da família BSP (Manjunath et al., 2007). Porém, ainda se desconhece os mecanismos de ação de diversas proteínas que possivelmente influenciam na resistência espermática a crioinjúria. Na tabela 1 encontram-se descritas as proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen, bem como suas funções quando descritas. As proteínas aSFP e osteopontina, temas desta tese, serão abordadas adiante.

2.3.1 Osteopontina (OPN)

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada que foi primeiramente descrita como secretada na matriz extracelular óssea (Franzen & Heinegard, 1985). A OPN liga-se ao cálcio e interage com o receptor de vitronectina e integrina (Gonçalves et al., 2007). Assim, possui importante função na fisiologia do tecido ósseo, sendo produzida pelos osteoblastos e osteoclastos. Sua identificação em diversos tecidos, sempre relacionada com adesão e reconhecimento celular, ampliou ainda mais sua importância (Moura, 2005).

TABELA 1 – Proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen.

Proteína	PM (kDa)	pI	Características e Funções	Referências
Albumina	66	5,4	Foi identificada em maior concentração em touros de alta congelabilidade. Sua adição ao sêmen resulta em aumento da motilidade. Está envolvida no efluxo de colesterol e fosfolídeos que ocorre durante a capacitação, modulando assim a constituição lipídica da membrana plasmática.	(Alvarez & Storey, 1985; Jobim et al., 2004)
BSP 30 kDa	30	5,7	Participa, junto com as outras proteínas BSP, na interação entre membrana plasmática e lípidios da gema de ovo, promovendo seu efeito protetor. Está envolvida na indução do efluxo do colesterol da membrana plasmática do espermatozóide, mediando a capacitação. Foi correlacionada a alta fertilidade em touros holandeses.	(Manjunath & Sairam, 1987; Thérien et al., 1998; Manjunath et al., 2007)
BSP A1/A2 (PDC-109)	16	3,6–5,2	Foi observada uma diminuição significativa (70-80%) na concentração das proteínas BSP ligadas à membrana espermática depois da criopreservação do sêmen, o que indica a ocorrência de modificações na membrana do espermatozóide durante a congelação. Com estas alterações nas propriedades da membrana, pode ocorrer a capacitação prematura do espermatozóide após o descongelamento. Desta forma, pode-se supor que a maior quantidade desta proteína no plasma seminal poderia conferir maior preservação das propriedades da membrana espermática durante o processo da congelação do sêmen. É a principal proteína de ligação à heparina do plasma seminal bovino, ligando-se especificamente aos colinafosfolídeos do espermatozóide no momento da ejaculação, mediando a capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolídeos. Também participa na promoção do efeito protetor dos lípidios da gema de ovo. Descreveu-se, ainda, sua ligação ao epitélio do oviduto, o que pode estar relacionado com a formação do reservatório espermático.	(Manjunath & Sairam, 1987; Nauc & Manjunath, 2000; Manjunath & Thérien, 2002; Gwathmey et al., 2003)
BSP A3	15	3,6–5,2	Outra proteína que provoca a indução do efluxo do colesterol da membrana plasmática do espermatozóide, mediando a capacitação. Porém, foi demonstrado uma alta concentração desta proteína ligada ao espermatozóide em sêmen de touros nelore de baixa fertilidade. Especula-se que o excesso desta proteína pode desestabilizar a membrana plasmática dos gametas, diminuindo a resistência ao choque osmótico e térmico.	(Manjunath & Sairam, 1987; Thérien et al., 1998; Roncoletta et al., 2006; Manjunath et al., 2007)

Continuação da TABELA 1.

Clusterina	70	5,7	Foi descrita uma maior concentração em touros de alta congelabilidade, porém seu mecanismo de ação não está elucidado. Possui atividade de chaperona, interagindo com proteínas danificadas corrigindo-as ou induzindo sua degradação, tendo ainda potencial antioxidante. É descrita a habilidade de inibir a lise espermática induzida por complemento. A clusterina liga-se a espermatozóides defeituosos, porém desconhece-se o mecanismo dessa interação. É sugerido que o acúmulo de clusterina nos espermatozóides seja um indicador de uma espermatogênese imperfeita, o que corrobora a correlação negativa com fertilidade observada.	(Howes et al., 1998; Hochgrebe et al., 1999; Humphreys et al., 1999; Ibrahim et al., 2000; Ibrahim et al., 2001; Reyes-Moreno et al., 2002; Jobim et al., 2004; Moura et al., 2007)
P25b	16,6	8,2	Proteína de membrana, incorporada durante a maturação epididimária. Participa na interação espermatozóide-oócito, e a sua baixa concentração foi relacionada com a infertilidade em bovinos. Durante a criopreservação, ela pode se desligar da superfície da membrana espermática, resultando em perda de potencial fecundante.	(Sullivan & Robitaille, 1989; Lessard et al., 1999; Lessard et al., 2000)

PM: Peso molecular; pI: Ponto isoelétrico.

A identificação da OPN no plasma seminal foi um dos resultados das pesquisas desenvolvidas pela equipe do Prof. Gary J. Killian, na Universidade do Estado da Pensilvânia, nos Estados Unidos. A partir da correlação de uma proteína de 55 kDa, pI 4,5 com a fertilidade de touros, através de eletroforese bidimensional, esta foi sugerida como dos marcadores de alta fertilidade existentes no plasma seminal bovino (Killian et al., 1993). Posteriormente, (Cancel et al., 1997) identificaram esta proteína como sendo a osteopontina. Com isso, a OPN foi amplamente estudada, tendo sido posteriormente descrita sua localização no trato reprodutivo masculino (Cancel et al., 1999), bem como sua expressão gênica na ampola e vesícula seminal de touros (Rodríguez et al., 2000). Destaca-se que, nos experimentos realizados nesta tese, foi identificada a expressão de OPN na próstata nos touros utilizados. Contudo, nem a proteína nem o mRNA foram descritos previamente neste tecido nos trabalhos de Cancel et al. (1999) e Rodríguez et al. (2000).

A OPN foi imunolocalizada nos compartimentos basais e intersticiais do túbulo seminífero de ratos, sendo provavelmente sintetizada pelas células de Sertoli. A estrutura da proteína possui diversos sítios de ligação a proteínas de superfície celular, como CD44, colágeno, fibronectina e especialmente a integrinas, proteínas chaves na ancoragem celular. Esta classe de proteínas de membrana tem importante papel na migração celular pelo epitélio seminífero durante a espermatogênese (Siu et al., 2003).

A natureza ácida da OPN foi atribuída à grande quantidade de ácido aspártico e ácido glutâmico (Franzen & Heinegard, 1985). A seqüência N-terminal SSEEK da OPN é um sítio de fosforilação (Pinna et al., 1979), e a

seqüência RGD está envolvida diretamente na adesão celular. Esta seqüência de aminoácidos liga duas folhas β pregueadas, sendo sítio de ligação para integrinas. Anticorpos contra o peptídeo RGD bloqueiam a adesão celular e sua deleção da estrutura da OPN inibiu a ativação de receptor de integrina (Butler, 1995). Gonçalves et al. (2007) demonstraram que a fertilização *in vitro* é prejudicada na presença do peptídeo RGD, bem como na presença de anticorpo anti-OPN. Estes resultados confirmam o papel dos receptores de integrinas para a interação espermatozóide-oócito e da importância da OPN no momento da fertilização (Figura 2). Também envolvida na adesão celular, a seqüência compreendida entre D298 e I305, na região C-terminal da OPN liga-se ao receptor de membrana CD44 e a heparina. A estrutura da OPN compreende ainda sítios de clivagem para metaloproteinase e trombina, bem como domínios de ligação para cálcio e hidroxiapatita (revisado por Moura, 2005).

A presença da OPN no plasma seminal é conferida, principalmente, pelas secreções da ampola e vesícula seminal, e possivelmente pelo epidídimo (Rodríguez et al., 2000) e próstata. A OPN também é secretada no oviduto da vaca, onde foram descritas, três isoformas dessa proteína: 55 kDa, 48 kDa e 25 kDa (Gabler et al., 2003). Este fato corrobora a importância da presença da OPN no local de fertilização, seja oriunda do plasma seminal ou da secreção tubária (Gabler et al., 2003).

É desconhecido qualquer papel da OPN na preservação, maturação e viabilidade espermática, porém foi demonstrado por Mônico et al. (2009) o aumento da capacitação em espermatozoides incubados com OPN purificada

do leite. Outros resultados já demonstraram sua influência na fertilização. A adição de OPN purificada do leite bovino aumentou a taxa de fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário em dois dos seis touros testados em comparação ao controle sem OPN. Os autores sugerem que uma parcela de indivíduos podem se beneficiar com a presença desta proteína (Gonçalves et al., 2008).

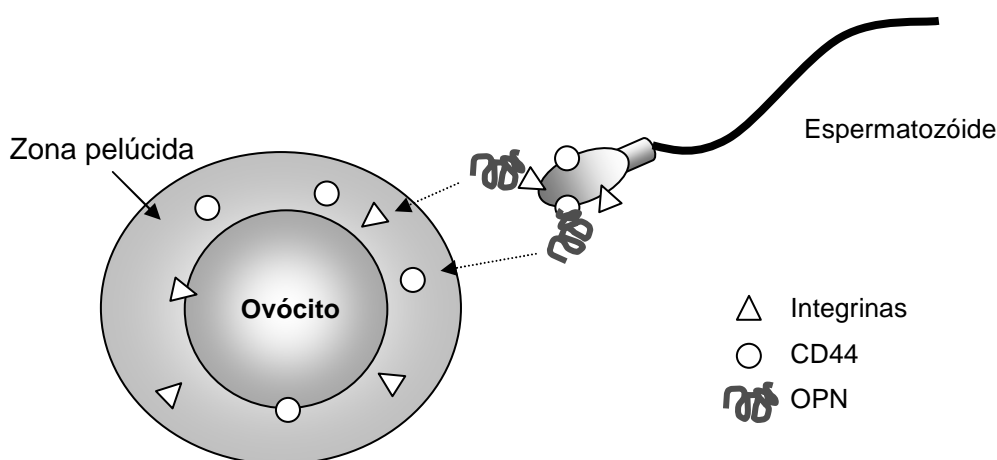


FIGURA 2 – Modelo para a interação entre a OPN, as integrinas e CD44 presentes nas membranas plasmáticas dos gametas masculinos e femininos (Adaptado de Moura, 2005).

2.3.2 Proteína Ácida do Plasma Seminal Bovino (aSFP)

A proteína ácida do fluido seminal (aSFP) é produzida principalmente pela vesícula seminal e na ampola (Wempe et al., 1992). Já foram sugeridas diversas atividades para esta proteína, tanto na proteção como na função do espermatozóide. A aSFP apresenta uma eficiente atividade antioxidante, devido às suas características químicas, como a presença de pontes dissulfeto (Einspanier et al., 1991; Einspanier et al., 1993). Este fato permite a manutenção de membranas plasmáticas celulares íntegras e funcionais (Einspanier et al., 1993; Moura et al., 2007) (Figura 3).

A aSFP pertence à família das espermedesinas, classe de proteínas de baixo peso molecular (12-16 kDa), que apresentam diferentes funções (Romão et al., 1997; Romero et al., 1997; Haase et al., 2005). Estas proteínas ligam-se à superfície do espermatozóide ejaculado (Haase et al., 2005) sendo, até o momento, identificadas no plasma seminal suíno [AWN, AQN-1, AQN-3, (Calvete et al., 1997); PSPI/PSP-II, (Varela et al., 1997)], bovino [aSFP, (Tedeschi et al., 2000) ; Z13, (Wempe et al., 1992)], eqüino [HSP-7, (Reinert et al., 1997)], no ovino [Espermedesina de 15,5 kDa, (Bergeron et al., 2005)] e mais recentemente no caprino [Bdh, (Melo et al., 2008)].

As espermedesinas são proteínas multifuncionais que apresentam uma grande capacidade de ligação a diversas biomoléculas como glicídios, fosfolipídios, inibidores de proteases, indicando o possível envolvimento em diversas fases do armazenamento espermático e fertilização (Calvete & Sanz, 2007). Compostas por 109 a 113 aminoácidos, são constituídas estruturalmente por um único domínio que serve como suporte estrutural, e ao qual se podem atribuir diferentes funcionalidades (Romero et al., 1997). Sendo assim, a interação da aSFP com o espermatozóide é devido a presença do domínio CUB, um motivo estrutural de aproximadamente 100 aminoácidos encontrado quase exclusivamente em proteínas que se associam na face extracelular da membrana plasmática (Romero et al., 1997). Este motivo está envolvido com diversas funções, como ativação de complemento, angiogênese, sinalização celular, inflamação e fertilização (Bork & Beckmann, 1993; Blanc et al., 2007).

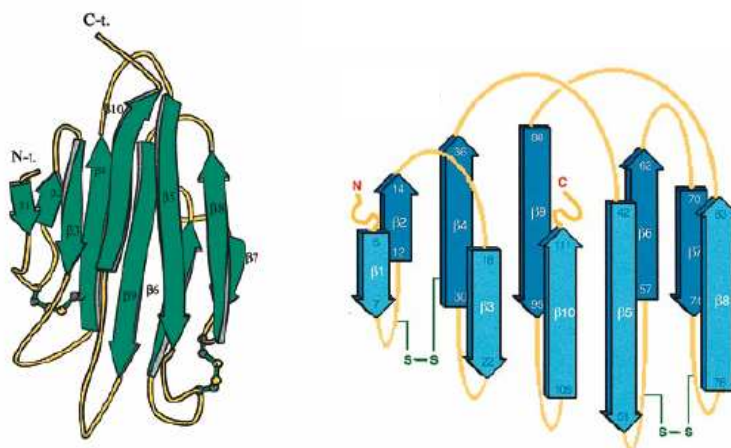


FIGURA 3 – Representação da estrutura da aSFP. Na figura da direita, estão representadas as pontes dissulfeto [Modificado de (Romão et al., 1997)].

A adição de aSFP purificada no sêmen bovino teve significativa influência nas características seminais. Houve redução da motilidade dos espermatozoides quando adicionada na concentração de 6 g/L, sendo também observada uma redução da atividade mitocondrial na concentração de 4 g/L, concentração fisiológica no plasma seminal bovino (Schöneck et al., 1996). No mesmo trabalho, foi demonstrada uma grande capacidade antioxidante dose-dependente, que foi observada através da quantificação da lipoperoxidação (Schöneck et al., 1996). Com estes resultados atribuiu-se a aSFP uma função de inibição de uma capacitação prematura, uma vez que esta pode ser iniciada por ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Rivlin et al., 2003). Presente em altas quantidades na ampola, ela promove uma economia de energia pela célula espermática através da diminuição da sua atividade metabólica e motilidade. A redução da atividade mitocondrial, apesar de levar a uma redução na produção de ATP, resulta numa menor produção de ROS. Deve-se considerar a grande quantidade de células

presentes nos reservatórios espermáticos (epidídimo e ampola), o que potencializa os efeitos deletérios dos radicais livres. Com isso, a aSFP não só previne a síntese de ROS, como também contribui na sua eliminação por possuir atividade antioxidante (Schöneck et al., 1996).

Estes efeitos cessam quando o ejaculado se difunde pelo útero, entrando em contato com as proteínas e outros constituintes do fluido uterino. A aSFP se dissocia da membrana plasmática do espermatozóide, ao mesmo tempo que outros fatores capacitantes ligam-se a ela, iniciando o processo de capacitação espermática. Com isso, é sugerido que esta proteína não atue na interação espermatozóide-ovócito (Dostalova et al., 1994).

Estudos comparando o perfil protéico do plasma seminal com dados de eficiência reprodutiva permitiram relacionar a aSFP com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros. Foi identificada uma concentração 8,5 vezes superior da aSFP no plasma seminal de touros com alta fertilidade em comparação aos touros de baixa fertilidade (Roncoletta et al., 2006). Utilizando índices de aproveitamento de partidas de sêmen viáveis a comercialização, Jobim et al. (2004) compararam os perfis protéicos do plasma seminal de touros de alta e baixa congelabilidade. Utilizando 16 animais e analisando os históricos de congelamento em um período de 2 anos, 10 foram considerados de alta congelabilidade, com índice de aprovação de 96,1%, e 6 touros classificados como de baixa congelabilidade, com 79,4%. Foi observada uma maior densidade ótica correspondente a aSFP em touros de alta congelabilidade do sêmen. O processo de criopreservação aumenta a

produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos espermatozóides (Chateerjee & Gagnon, 2001), levando a lipoperoxidação e redução da função das membranas plasmáticas. Conseqüentemente, a presença quantitativamente superior da aSFP nos reprodutores de alta congelabilidade do sêmen pode ser estar relacionada com a capacidade antioxidante conferida por esta proteína. Assim, a aSFP foi indicada como candidata a marcadora da alta congelabilidade do sêmen bovino (Jobim et al., 2004).

2.4 Criopreservação do sêmen bovino

A criopreservação de sêmen é o processo de preparação de uma suspensão de espermatozóides em um diluente apropriado que permita a sobrevivência celular durante a congelação, estocagem a -196°C e descongelação. A partir dos primeiros resultados com a criopreservação do sêmen obtidos por Polge e Rowson na década de 50 (Polge & Rowson, 1952), a técnica desenvolveu-se rapidamente gerando um novo mercado de comercialização para o sêmen congelado e auxiliando no estabelecimento de novas biotecnologias, acelerando assim o ganho genético no rebanho bovino.

Apesar dos avanços tecnológicos, a inseminação artificial ainda encontra barreiras no que se refere a congelação do sêmen. Em centrais de inseminação artificial, freqüentemente são encontrados touros selecionados quanto aos aspectos produtivos e que, entretanto, mostram dificuldade para a congelação adequada do material fecundante, apesar do quadro espermático normal quanto aos aspectos físicos e morfológicos.

A predição da fertilidade dos machos, e mais recentemente da

congelabilidade, ainda é tema de discussão (Rodríguez-Martínez, 2003; Amann, 2005; Aitken, 2006). O exame andrológico padrão utilizado atualmente foi definido com base em diversos estudos sobre a influência de diferentes características seminais na fertilidade dos machos. Porém, diversos autores ainda questionam sua validade, criticando as metodologias de pesquisa, assim como a análise estatística dos resultados (Amann, 1995; Watson, 2000; Amann, 2005; Kuisma et al., 2006)

A partir destas dúvidas, desenvolvem-se técnicas de avaliação mais apuradas da viabilidade do sêmen (Rodríguez-Martínez, 2003), bem como aprimorou-se a busca por marcadores protéicos de fertilidade e congelabilidade do sêmen (Jobim et al., 2004; Moura et al., 2006a; Roncoletta et al., 2006).

2.4.1 Efeitos da criopreservação no espermatozóide

As razões pelas quais os espermatozóides de diversas espécies possuem uma maior ou menor sensibilidade a criopreservação incluem: a complexa estrutura da célula espermática, as diferenças de forma e tamanho desses espermatozóides, as características distintas de acrossoma e a complexa e heterogênea natureza da membrana plasmática (Snoeck, 2003).

Durante o processo de congelação ocorrem danos provocados pelas baixas temperaturas a que são submetidos os espermatozóides: formação de cristais de gelo intracelulares, aumento da concentração intracelular de solutos e modificações correlacionadas, resultantes da desidratação celular. Danos celulares podem ser causados diretamente, afetando estruturalmente as

organelas (ruptura de membranas), ou indiretamente, alterando as funções celulares através do processo metabólico (Holt, 2000).

Em condições de estresse, provocadas pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo o rompimento da membrana (Amman & Graham, 1992). Na membrana plasmática do espermatozóide, esse estresse está relacionado à fase de transição dos lipídios, a qual altera o estado funcional da membrana (Holt, 2000). Quando a temperatura é reduzida, os lipídios sofrem uma fase de transição de um estado fluído, na qual a interação entre as cadeias de ácidos graxos é relativamente desorganizada, para um estado de gel, no qual a cadeia de ácidos graxos torna-se rígida e paralela (Amman & Graham, 1992). Os efeitos causados pela fase de transição dos lipídios provocam respostas cinéticas não-lineares em algumas enzimas, incluindo algumas ATPases de membrana, cuja atividade depende do estágio físico dos lipídios (Holt, 2000). Outros componentes da membrana podem ser alterados pelo estresse da temperatura. As proteínas da membrana são agrupadas na fase de transição lipídica, e é esperado que isso altere a função, especialmente das proteínas que sofrem modulação estrutural para realizar sua função, como os canais iônicos protéicos (Holt, 2000).

Também a permeabilidade da membrana aumenta no resfriamento (Robertson & Watson, 1986), devido ao incremento nas alterações da membrana ou a efeitos específicos nos canais protéicos. A regulação do cálcio é afetada pela refrigeração, o que provoca sérias conseqüências na função celular (Bailey & Buhr, 1994), sendo as alterações, em alguns casos,

incompatíveis com a viabilidade da célula. A 5°C, aumenta a permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} , ele se acumula na célula, contribuindo para alterações semelhantes às ocorridas no processo da capacitação e nos eventos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana externa do acrossoma (Watson et al., 1995).

Alterações significativas na pressão osmótica ocorrem durante a criopreservação. O estresse induzido pela formação dos cristais de gelo é principalmente associado a alterações na pressão osmótica da fração não-congelada (Watson & Duncan, 1988). A água congela e cristaliza como gelo fora da célula; a pressão osmótica do líquido remanescente do soluto aumenta podendo romper a membrana espermática, extremamente sensível ao estresse osmótico (Watson, 2000) Este evento também pode afetar o citoesqueleto celular (Watson, 1995) e efeitos similares acontecem durante o descongelamento (Holt, 2000).

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

A concentração de colesterol na membrana está diretamente relacionada com a fluidez desta organela, que é determinada pela proporção colesterol:fosfolípidios, bem como pela natureza de suas cadeias (maior ou menor grau de insaturação). Quanto maior a proporção colesterol:fosfolípidios maior é a resistência a membrana plasmática às mudanças de temperatura (Amann & Pickett, 1987; Medeiros et al., 2002; Barbas & Mascarenhas, 2009).

Durante a criopreservação, o colesterol induz a diminuição da temperatura na qual a membrana sofre a mudança de fase fluida-cristalina para gel, promovendo uma melhor estabilização da membrana dos espermatozóides durante o processo (Kirk et al., 2001). Uma variação na composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides ocorre entre as espécies (Eddy, 2006). O espermatozóide humano, bovino e do coelho apresentam a maior proporção de colesterol na membrana plasmática, levando a melhores resultados na criopreservação. Por outro lado, em eqüinos e suínos, esta proporção é menor, tornando os espermatozóides destas espécies mais sensíveis ao choque térmico durante a redução da temperatura (Meseguer et al., 2004; Moore et al., 2005; Jones et al., 2007; Tannert et al., 2007).

A integridade da cromatina é fundamental para o desenvolvimento embrionário, apesar de não possuir papéis funcionais durante o armazenamento e a fertilização (Lopes et al., 1998; Sakkas et al., 1999; Agarwal & Said, 2005). Com a ultracompactação da fita de DNA e a drástica redução do conteúdo citoplasmático ao final da espermição, o espermatozóide perde a capacidade de reparação de quebras e mutações no seu genoma (Twigg et al., 1998). Embora o espermatozóide possa apresentar motilidade e integridade de membrana para fecundar, o dano a cromatina espermática não permite o desenvolvimento embrionário (Watson, 2000). Em alguns casos de infertilidade em homens, foi detectada alta incidência de fragmentação de DNA espermático (Sergerie et al., 2005). Todavia, o dano ao genoma pode ser induzido ou agravado pelo processo de criopreservação, especialmente pela geração de ROS (Lopes et al., 1998; Baumber et al., 2003).

2.5 Produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

A produção em larga escala de proteínas recombinantes para subsequente purificação é hoje uma técnica dominada. Importantes aplicações desta tecnologia englobam sua utilização em imunização, estudos bioquímicos, análise tridimensional da proteína, uso biotecnológico e terapêutico (Balbas, 2001; Pavlou & Reichert, 2004). Atualmente, o uso de proteínas recombinantes é rotina tanto na pesquisa quanto na indústria farmacêutica. Somente nos Estados Unidos, o uso da tecnologia do DNA recombinante na produção de fármacos envolve mais de 110 empresas, movimentando em 2003 mais de 32 bilhões de dólares (Pavlou & Reichert, 2004).

A produção de proteínas recombinantes envolve a clonagem do gene apropriado em um vetor de expressão sob controle de um promotor induzível. Com a obtenção ótima da expressão, a purificação é o próximo passo para se obter uma molécula biologicamente ativa (Makrides, 1996).

Entre vários sistemas de expressão heteróloga hoje disponíveis, o uso da bactéria gram negativa *Escherichia coli* continua como a opção mais atraente devido a seu rápido crescimento em alta densidade de cultura, baixo custo, e o amplo conhecimento adquirido sobre sua genética (Schumann & Ferreira, 2004). Com isso, foram desenvolvidas inúmeras linhagens geneticamente modificadas para diferentes condições de expressão, bem como vetores a serem utilizados, ambos disponibilizados comercialmente (Makrides, 1996).

Entretanto, apesar da já caracterizada genética e biologia molecular da *E. coli* como fábrica de proteínas, não há garantias de que todo o gene pode

ser expresso eficientemente em uma bactéria Gram negativa. Especialmente quando a proteína recombinante de interesse é de organismo eucarioto (Baneyx, 1999). A arte da fabricação de proteínas está baseada em “regras empíricas” (Makrides, 1996) que fornecem um guia que diminui o tempo gasto em tentativas e erros. Não existe protocolo padrão para a síntese e purificação de proteínas recombinante. Cada caso deve ser otimizado através de constantes ajustes nas metodologias.

Diversos fatores afetam o nível de expressão da proteína recombinante, como: (i) características ímpares do gene, (ii) estabilidade e eficiência do mRNA produzido, (iii) correta e funcional conformação estrutural da proteína, (iv) códons necessários para a tradução, (v) ação de proteases e (vi) toxicidade da proteína (Makrides, 1996; Baneyx, 1999; Balbas, 2001; Baneyx & Mujacic, 2004; Berrow et al., 2006)

As principais desvantagens no uso de *E. coli* como sistema de expressão incluem (1) a inabilidade da bactéria de realizar as modificações pós-tradução que ocorrem em eucariotos, (2) a ausência de um mecanismo de secreção da proteína alvo para o meio de cultura (o que facilitaria a purificação), e (3) a limitada habilidade de promover a formação de pontes dissulfeto (Makrides, 1996; Balbas, 2001; Sahdev et al., 2008). Todavia, diversas estratégias já foram desenvolvidas para contornar estes problemas, resultando na síntese de inúmeras proteínas recombinantes biologicamente ativas (Kim & Raines, 1993; Makrides, 1996; Thomas et al., 1997; Wu et al., 2004; Garde et al., 2007; Elorza et al., 2009; Lefebvre et al., 2009).

O papel das proteínas do plasma seminal na criopreservação do

sêmen vêm sendo aos poucos elucidado. Embora muitas de suas funções estejam bem descritas, o mecanismo de ação na proteção de estruturas celulares como membrana plasmática, proteínas de membranas, axonema, mitocôndrias e cromatina durante a curva de congelação, manutenção a -196°C e descongelação, ainda não foi perfeitamente elucidado. Neste contexto, esta tese visa à elaboração de um sistema de expressão de proteínas recombinantes do plasma seminal como ferramenta para o estudo de suas funções biológicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação de Biblioteca de cDNA

Para obtenção das seqüências gênicas relativas às proteínas aSFP e OPN, foi criada uma biblioteca de DNA complementar a partir de RNA isolado de tecidos reprodutivos masculinos. Em abatedouro localizado em Munique (Schlachthof München, Bavária, Alemanha) foram coletados de bovinos machos da raça Fleckvieh, amostras de tecido de próstata, glândula bulbo-uretral e vesícula seminal de três animais, sendo essas armazenadas a – 80 °C até o processamento.

3.1.1 Isolamento de RNA

Após descongeladas, as amostras de abatedouro foram cortadas em fatias com aproximadamente 25 mm³ (5 x 5 x 1 mm), sendo colocadas em tubo com 1 mL de Trizol® (Invitrogen, Califórnia, EUA). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e, após 5 minutos, eluidas em 0,2 mL de clorofórmio. As soluções foram agitadas em agitador por 15 segundos e centrifugadas a

12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo RNA foi então transferido para novo microtubo com 0,5 mL de álcool isopropílico. Após 10 minutos de incubação, o material foi novamente centrifugado nas mesmas condições por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, sendo o precipitado ressuspenso em 1 mL de etanol e homogeneizado em agitador. Seguiu-se nova centrifugação a 7500 rpm por 5 minutos a 4 °C, sendo após retirado o sobrenadante (etanol) e, após a secagem do precipitado, este foi ressuspenso em água estéril livre de RNase (Sterile DEPC Water RNase Free[®], Aestus Pharmaceuticals, Watkinsville, EUA) (Sambrook & Russell, 2001). Para evitar a ação de RNases e de outras enzimas, as amostras foram aquecidas a 55 °C por 10 minutos. A concentração de RNA em cada amostra derivada de cada tecido foi medida por espectrofotometria em 260 e 280 nm (Beckman, Harbor Boulevard, EUA).

3.1.2 Digestão do DNA contaminante no isolado de RNA

Devido a possibilidade de contaminação e interferência com DNA no isolado de RNA, as amostras foram tratadas com DNase. Em um microtubo foram adicionados 5 µg de RNA, 2 µL de 10x DNase I Reaction Buffer e 1 µL de DNase I. Os tubos foram colocados em um Thermomixer[®] (Eppendorff, Hamburg, Alemanha) por 30 segundos a 37 °C, sendo após, rapidamente transferidos para outro Thermomixer[®] a 75 °C, por 10 segundos, para inativar a enzima DNase I.

3.1.3 Síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR)

A síntese de cDNA, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR), foi iniciada com o anelamento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) aleatórios, utilizando 5 µg das amostras de RNA, acrescidas de 3 µL de *primers* randômicos (Random Hexamer Primers[®], Invitrogen), e 1 µL de 10 mM dNTP Mix[®] (Invitrogen). Logo após, foram aquecidas a 65 °C por 5 minutos, sendo após transferidas para o gelo. Com a formação de trechos dupla-fita híbridas de RNA:DNA, foram adicionados 4 µL de 5x First Strand Buffer[®], 2 µL de 0,1 M DTT e 1 µL de RNase Out[®]. Após incubação a 25 °C por dois minutos, foi adicionado 1 µL de Superscript II[®] (transcriptase reversa) (Invitrogen). As amostras foram colocadas em um termociclador que operou na seguinte seqüência: 25 °C por 10 minutos, 42 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos. Logo após, as amostras foram armazenadas a – 20 °C (Sambrook & Russell, 2001).

3.2 Obtenção das seqüências das proteínas aSFP e OPN e escolha do vetor de expressão

Para a obtenção do fragmento com as seqüências das proteínas em estudo, foram construídos *primers* específicos, baseados nas seqüências gênicas descritas disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para a aSFP, foi utilizada a seqüência NM_174616 (Figura 4) (Wempe et al., 1992), e para a proteína OPN, foi usada a seqüência M66236 (Figura 5) (Kerr et al., 1991).

```

1  aggagggctc ttaagaccag gcagctggga cgtcagactg gtcctgcttc tgccactggt
61  gccctggaat gtgggcaagt cccttggcct ctctgggtct caggtcctct cctgtccaag
121 gtgttgtag gcttatgcaa gtcactggag gtgaacatgc tgaagcttaa cctcagacag
181 gagggctccc aaataagagt tctgtgtggc cattgggtcca tgtcacctat tatctaggac
241 cgcaggaaga ggagaggaag aaaagaaatt ggtcattatt tcccagggga taaaggcaca
301 gaaagtgtgt gacaaagaca cagagaaagc agcaggcagc ccgcttctcc tagagaactg
361 gggactcccg cagccctgcg gggctgggct ccaggggagg aggaggtcag gtgtcagctg
421 ctgtgtgat atagccccag gcctccgggg ccgggctcag tgctgaggct ggtgccaggc
481 tgtgaagatg aagctgtcca gcgtcatccc ttgggccttg ctgctcagca cagccacagt
541 ggattcaatg gactggctcc cccggaatac taactgtggg ggaatcctca aagaggagtc
601 tggagtgatc gccacctatt acggaccgaa aacaaactgt gtctggacta tccagatgcc
661 accagagtac catgttaggg tgtctatcca atatctccaa ctcaactgta ataaagagtc
721 tctggagatt atagatgggc tgccaggatc tctgtctta gggagattt gtgaaggttc
781 actcatggat tatagatctt ctggcagtat catgactgtc aagtacatca gagagcctga
841 gcaccagct tctttctatg aagtgttata ctttcaggat ccacaagctt agtgatctct
901 gctcaggcct gaggggacaa gcgttgcaaa agagaacaac attccttgaa gaccctctgg
961 aatcagctgc ccacaaggag aagcatcttc tgatcacctg ctctcagcct gtcacctcca
1021 tcctttccag cccctggctc cctaactgca gaaagattcc ttactactga gctttagatt
1081 gttgccagtc ttgtggttag ttccttctct ttatcattat aatcattttg aataatgaaa
1141 aaaaaaaaaa aaa

```

FIGURA 4 – Sequência do cDNA de aSFP bovina. Em negrito, o códon de início da tradução (nucleotídeos 488 ao 490) e o códon de término da tradução (nucleotídeos 890 ao 892).

Para expressão das proteínas em bactéria *E. coli*, foi escolhido o plasmídeo comercial pET23a(+)[®] (Novagen, Darmstadt, Alemanha) (Figura 6). Este vetor possui no final do seu sítio múltiplo de clonagem a região para síntese de etiqueta de poli-histidina (His-Tag) (Figura 7). Os insertos de cDNA para as proteínas aSFP e OPN foram clonados no vetor de forma a sintetizar proteínas recombinantes fusionadas com His-Tag.

Esta etiqueta codifica para a formação de um bloco de seis histidinas em seqüência. Através de cromatografia por afinidade, somente as proteínas recombinantes com His-Tag ligam-se à coluna de níquel, sendo separada (purificada) das demais proteínas da bactéria usada na expressão (Novagen, 2006).

Para a inserção das seqüências de cDNA para expressão das proteínas OPN e aSFP, foram utilizados os sítios de restrição *Nde* I (5' CAT↓ATG 3') e *Xho* I (5' C↓TCGAG 3') presentes no sítio múltiplo de

clonagem (MCS) do plasmídeo (Figura 7) (Novagen, 2006).

```

1 ctgctcagca tcacagggga ctggactcct ctcgccgccc cagaccaagg aaaatcatt
61 accatgagaa ttgcagtgat ttgcttctgc ctcttgggca ttgcctccgc ccttccagtt
121 aaaccgacca gttctggcag ctctgaggaa aagcagctta acaacaaata cccagatgct
181 gtagccatat ggctaaagcc tgacccatct cagaagcaga ctttcctaac accacagaat
241 tctgtgtcct ctgaggaaac tgatgacaac aaacaaaata ccctcccaag taagtccaat
301 gaaagccctg agcaaacaga cgatctagat gacgatgatg ataacagcca ggacgtcaac
361 tctaagtact ccgacgacgc tgaaaccact gatgaccctg accattccga cgagtctcac
421 cattctgatg aatctgatga agttgatttt cccactgata ttccaacaat cgcagttttc
481 actccgttta tccctacgga aagcgcaaat gatggccgag gtgatagtgt ggcttacgga
541 ctgaagtcaa gatctaagaa gttccgcccga tctaacgttc agagtccaga tgccacagag
601 gaggacttca catcacacat agagagtgag gagatgcatg acgcacctaa gaagacgagt
661 cagctgactg accacagcaa ggaaaccaac agtagcgagc tttccaaaga actcacgcca
721 aaggccaagg ataagaacaa gcattccaat ctgattgaga gtcaggaaaa ttccaaactc
781 agccaagaat tccatagcct tgaagacaag ctagacctag atcataagag tgaagaagac
841 aaacacctga aaattcgtat ttctcatgaa ttagatagtg cctcttctga ggtcaattga
901 aaggagaaaa tacaatttct tactttgctt ttagtaaac gaaaaggata cattaagca
961 ggggtgggaga caatatgaaa tgcataatttc tcagcttagt tggatgatgt atatgtgtgt
1021 agatctggaa acagatcatg tttttgatca ttagtttaat gtgtggcttc atggtaacac
1081 ctttctaaac taaaagcttc agagtttagt ctatgttctt tccacataca aaatgcaaac
1141 catcacagca ttttaatggt tgctaccctt ttaggaatag aaattcatgt agaagcaaac
1201 aaaatactgt tacacacttt taagaaagaa tataaaattt gatgtcacta tgatcttttg
1261 ttttttaaat tagtatatat tttgttgtga ttattttttc tgttgtgaaat aaatctttta
1321 tcttgaatgt g

```

FIGURA 5 – Seqüência do cDNA de OPN bovina. Em negrito, o códon de início da tradução (nucleotídeos 64 ao 66) e o códon de término da tradução (nucleotídeos 898 ao 900).

Para a amplificação da seqüência de cDNA da aSFP e OPN a partir da biblioteca de cDNA, foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 2.

TABELA 2 - Descrição dos *primers* utilizados na amplificação das seqüências codificantes para as proteínas aSFP e OPN

PRIMER	SEQÜÊNCIA
aSFP#1 (sense)	5' GTCCATATGAAGCTGTCCAGCGTCAT 3'
aSFP#2 (antisense)	5' AGTCTCGAGAGCTTGTGGATCCT 3'
OPN#1 (sense)	5' GTCATTAATATGAGAATTGCAGTGATTTGC 3'
OPN#2 (antisense)	5' ATTCTCGAGATTGACCTCAGAAGAGGC3'

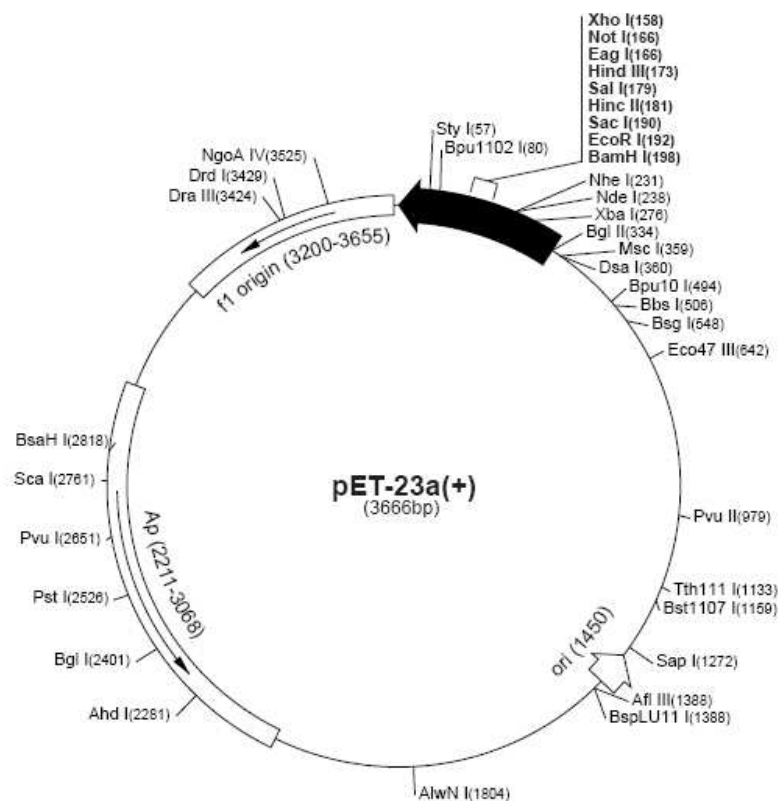


FIGURA 6 – Representação esquemática do plasmídeo pET23a(+). A Seta preta indica o sítio de clonagem múltipla do vetor. Modificado de (Novagen, 2006).



FIGURA 7 – Representação esquemática da seqüência do sítio de clonagem múltipla do vetor pET23a(+). As setas cheias indicam os sítios de clivagem para as enzimas *Nde* I e *Xho* I. A seta vazada indica o His-Tag. Modificado de (Novagen, 2006).

3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em aparelhos termocicladores UNO II Thermoblock (Biometra GmbH, Göttingen, Alemanha), TC-4000 (Techne UK, Staffordshire, Inglaterra). Para a amplificação de cada seqüência (cDNA para OPN e aSFP) foram usados 4 µL dos bancos de cDNA feitos a partir de tecido da próstata, vesícula seminal e glândula bulbo-uretral. Às amostras foram adicionados 10 µL dos respectivos *primers* sense e antisense, 10 µL de 5x Buffer, 1 µL de 10 µM dNTP, 0,5 µL de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e 14,5 µL de água Milli-Q[®]. As reações foram incubadas a 94 °C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de incubações a 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Por último, as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos, sendo após resfriadas até 4 °C, e armazenadas a – 20 °C.

3.3 Clonagem intermediária em vetor pCR[®]2.1-TOPO[®]

Para uma maior eficiência de clonagem, foi realizada uma pré-clonagem em um vetor plasmidial pCR[®]2.1-TOPO[®], que faz parte do TOPO TA Clonning Kit[®] (Invitrogen) (Invitrogen, 2006b) (Figura 8). O uso deste sistema facilita a manipulação dos produtos de PCR, pois estes são clonados em um sítio único de inserção pela enzima topoisomerase presente no sistema. Os plasmídeos construídos nesta etapa chamar-se-ão pTOPO-aSFP e pTOPO-OPN.

A reação foi realizada utilizando 2 µL dos produtos de PCR, ou seja, as seqüências codificantes para aSFP e OPN amplificadas; 1 µL de Salt

Solution e 1 μ L do vetor TOPO. A mistura foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, sendo após, colocada em gelo. A análise de eficiência de ligação foi realizada através de ensaio de restrição com *EcoRI* (3 μ L de plasmídeo ligado, 3 μ L de *EcoRI* Buffer, 1 μ L de *EcoRI* e 23 μ L de água, a reação foi realizada a 37 $^{\circ}$ C por 2 horas).

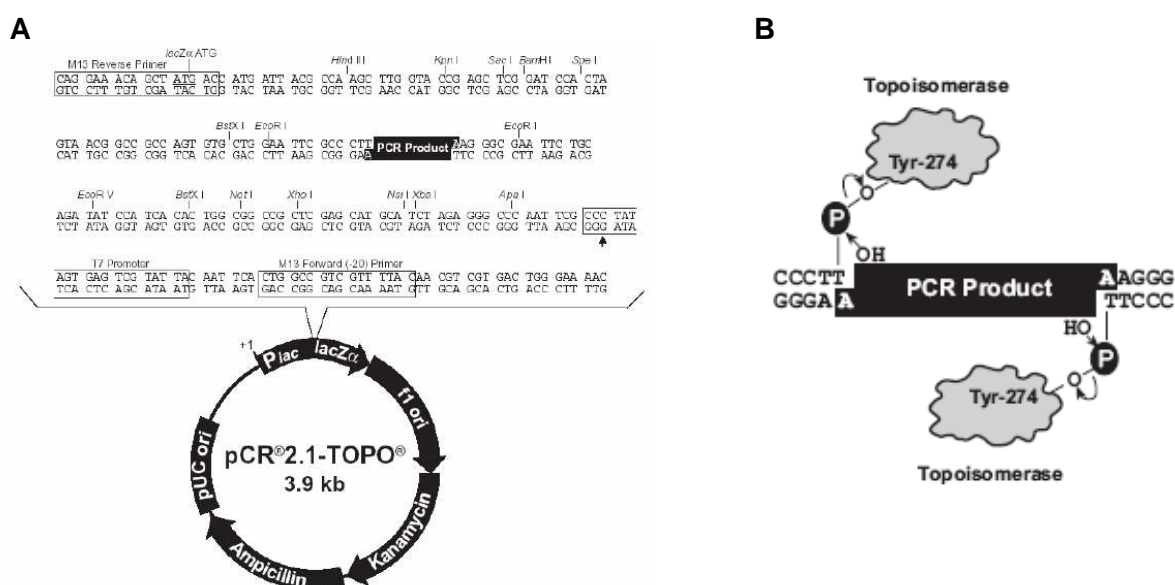


FIGURA 8 – A: Representação esquemática do plasmídeo pCR®2.1-TOPO e da seqüência do sítio de clonagem múltipla. Em detalhes estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência aos antibióticos ampicilina e canamicina; a seqüência do sítio de clonagem de produtos de PCR e os sítios para as enzimas de restrição. B: Representação da ação da enzima topoisomerase que liga o inserto de PCR sem a necessidade de ligação coesiva, a partir do resíduo 3' deoxitimidina (T) (Invitrogen, 2006b).

3.4 Análise da eficiência da ligação dos insertos no vetor TOPO

3.4.1 Transformação de linhagem de *E. coli* TOP10®

Com o objetivo de aumentar o número de cópias dos plasmídeos

pTOPO-aSFP e pTOPO-OPN, estes foram inseridos em linhagens de *E. coli* TOP10[®] termocompetente (Invitrogen) ou JM-109 eletrocompetente (Promega) (Tabela 3).

Para a transformação, foram utilizados 40 µL de cultura bacteriana congelada em solução de 10% de glicerol e armazenadas a – 80 °C. Os tubos com bactérias foram descongelados por 15 minutos (Invitrogen, 2004). Em seguida, foram adicionados 2 µL do vetor pré-clonado, sendo o tubo rapidamente aquecido no Thermomixer[®] a 42 °C por 30 segundos, sendo após, novamente retornado ao gelo. Foram adicionados 250 µL de meio Luria-Bertani (LB) (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%, peso/volume) e os tubos permaneceram sob agitação em estufa de cultura bacteriana por 1 hora a 36 °C. Após este período, 60 µL de cultura foram plaqueados em meio LB sólido (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; agar 1,5%, peso/volume) com ampicilina (100 µg/mL) e com X-gal, usado como marcador de colônias de bactérias transformadas com plasmídeo com o gene lacZ truncado (Invitrogen, 2004). As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas. Após este período, foi escolhido um clone na placa de cultura, e este foi coletado e inoculado em meio líquido para multiplicação e extração de DNA plasmidial.

TABELA 3 – Descrição do genótipo da linhagens *E. coli* TOP10 e JM-109

Linhagem de <i>E. coli</i>	Genótipo
JM109	<i>recA 1, endA 1, gyrA 96, thi, hsdR 17 (rk-, mk+), supE44, relA 1, l-, D(lac-proAB), [F', traD 36, proAB, lacIq ZDM15]</i>
One Shot [®] TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>

3.4.2 Extração de DNA plasmidial de bactéria usando *kit* comercial

Para extração de DNA plasmidial de bactérias através de kit, foi utilizado o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Düsseldorf, Alemanha), conforme as instruções do fabricante (Qiagen, 2006).¹

Um clone isolado de *E. coli* foi expandido em 5 mL de meio LB líquido com antibiótico apropriado e foi incubado a 37°C, sob agitação, por 12 a 16 horas. A cultura foi centrifugada a 800 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células foi ressuspendido em 250 µL de tampão P1, sendo acrescentado após o tampão P2, seguido de suave homogeneização. Foi adicionado tampão N3, homogeneizado por inversão, sendo após centrifugado por a 14.000 rpm 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para a microcoluna de purificação e novamente centrifugado nas mesmas condições por 1 minuto. O filtrado foi descartado, sendo adicionado à coluna 750 µL de tampão PE, seguido de nova centrifugação por 1 minuto. O filtrado foi novamente descartado e a coluna foi lavada com 50 µL de tampão EB. Após 1 minuto de incubação em temperatura ambiente, nova centrifugação foi realizada por 1 minuto. A microcoluna foi descartada e o DNA plasmidial armazenado a -20°C (Sambrook & Russell, 2001).

3.4.3 Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% em 0,5X TBE (Tris-HCl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM) (Figura 9) . A

¹ Os componentes dos tampões P1, P2, N3, PE e EB não estão descritos no Manual do "QIAprep Spin Miniprep Kit".

amostra de DNA foi adicionada de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%, EDTA 1 mM), e aplicada no gel contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. O gel foi submetido à voltagem de 80–100V fornecido por fonte de energia Amersham modelo EPS 1001, utilizando tampão 0,5X TBE. O DNA foi visualizado através de iluminação ultravioleta, a 512 nm. Como padrão de corrida, foram usados pUC Mix Marker[®] e Gene Ruller 1Kb DNA Ladder[®] (Fermentas, Glen Burnie, EUA).

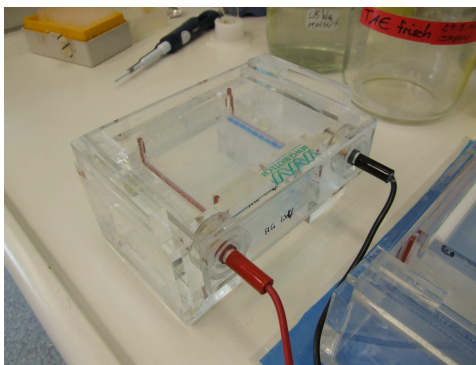


FIGURA 9 - Cuba de eletroforese para gel de agarose.

3.5 Construção dos plasmídeos pET-aSFP e pET-OPN

3.5.1 Preparação dos insertos

Para expressar as proteínas bovinas aSFP e OPN em célula procariótica, foram construídos os plasmídeos pET-aSFP e pET-OPN. As seqüências nucleotídicas referentes às proteínas foram obtidas de acordo com o protocolo descrito no item 3.2.1, e clonadas no vetor TOPO (item 3.3). Posteriormente, essas seqüências foram isoladas do vetor TOPO por tratamento com as endonucleases de restrição *Nde* I e *Xho* I (New England

BioLabs, Ipswich, EUA). As reações (Tabela 4) foram incubadas a 37 °C por 90 minutos.

3.5.2 Preparação do vetor de expressão pET23a(+)

A semelhança da preparação dos insertos de DNA, o plasmídeo pET23a(+) foi submetido a tratamento com as endonucleases de restrição *NdeI* e *XhoI* (tabela 5). Assim, é garantido que ambos, insertos de DNA e vetor, tenham extremidades coesivas para a perfeita ligação entre eles. A reação ocorreu a 37 °C durante 90 minutos.

Após este período, o tubo foi aquecido a 65 °C por 20 minutos, para inativação das enzimas de restrição. Com o plasmídeo linearizado, foi feita a desfosforilação do vetor com 1 µL de CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Invitrogen) a 37 °C por 30 minutos.

3.5.3 Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose

Para o isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose (1 a 2%), foi utilizado o JetQuick (Genomed GmbH, Löhne, Alemanha)². Após separação dos fragmentos de DNA através de eletroforese, as bandas de interesse foram recortadas do gel e colocadas em microtubo com 300 µL do tampão L1, sendo incubados por 15 minutos a 50 °C.

A reação foi colocada numa microcoluna de purificação e centrifugada por 1 minuto a 14.000 rpm. O filtrado foi descartado, e foi adicionado 500 µL de tampão L2 na coluna, seguido de incubação em

² Os componentes dos tampões L1, L2 e TE não são descritos no Manual do JetQuick.

temperatura ambiente por 5 minutos. Foram realizadas duas novas centrifugações, com descarte dos filtrados. Finalmente, foram adicionados à coluna 30 μL de tampão TE (previamente aquecido a 70 $^{\circ}\text{C}$), acompanhado de nova centrifugação por 2 minutos. Os filtrados contendo os DNA isolados dos géis foram identificados e armazenados a – 20 $^{\circ}\text{C}$. A lúquotas das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para confirmação do isolamento dos fragmentos (Genomed, 2005).

TABELA 4 – Reação de retirada do inserto clonado no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®]

Reagente	Volume (em μL)
pTOPO-aSFP	18
Buffer #4 (NEB)	6
<i>Nde</i> I	2,5
<i>Xho</i> I	2,5
100x BSA	0,6
H ₂ O	30,4
Total	60

TABELA 5 – Reação clivagem do vetor pET23a(+).

Reagente	Volume (em μL)
pET23a(+)	5
Buffer #4 (NEB)	6
<i>Nde</i> I	1,5
<i>Xho</i> I	1,5
100x BSA	0,6
H ₂ O	45,4
Total	60

3.5.4 Ligação dos insertos no pET23a(+)

A reação de ligação, concluindo a clonagem dos insertos de DNA para as proteínas bovinas aSFP e OPN, foi realizada adicionando em

microtubos 4 μ L do vetor pET23a(+) linearizado, 9 μ L de inserto para aSFP ou 8 μ L de inserto para OPN, 2 μ L de Ligation Buffer (Invitrogen), 1 μ L da enzima T4 Ligase (Invitrogen) e água Milli-Q (q.s.p. 20 μ L). A reação ocorreu a 16 $^{\circ}$ C por 12 h, sendo posteriormente submetida a 22 $^{\circ}$ C por 6 horas.

Os 20 μ L da reação foram usados para transformar *E. coli* TOP10 conforme descrito no item 3.4.1, e os plasmídeos pET-aSFP e pET-OPN extraídos do gel segundo o protocolo do item 3.4.2. A verificação da eficiência da ligação foi realizada por ensaios de restrição e PCR usando primers que anelam no inserto e no plasmídeo, sendo visualizado através de eletroforese em gel de agarose. Os primers estão descritos na Tabela 6.

TABELA 6 – Primers utilizados na avaliação dos clones e seqüenciamento.

Primer	Seqüência	TM ($^{\circ}$ C)
T7 Promoter	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	47,5
T7 Terminator	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	53,4
OPN Inner Sense	5' ACGAGTCTCACCATTCTGATG-3'	59,9
OPN Inner Antisense	5' GATCTTGACTTCAGTCCGTAAGC 3'	55,3
aSFP Inner Sense	5' CGCCACCTATTACGGACCGAAAAC 3'	54,3
aSFP Inner Antisense	5' TCCCTAAGACAGGAGATCCTGGCA 3'	60,1

3.5.5 Seqüenciamento das construções

Os plasmídeos construídos durante o processo de clonagem foram seqüenciados para confirmação da presença do gene, bem como sua correta orientação e localização dentro do mesmo. O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2

pmol dos primers descritos na Tabela 5 e 2 μ L do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 μ L. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 μ L de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"*; *BioLIMS Project "3100_Project1"*; *Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz"*.

3.6 Expressão de aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis em *E. coli*

3.6.1 Linhagens de *E. Coli* para expressão de proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas recombinantes, foram utilizadas linhagens de *E. coli* comerciais modificadas geneticamente para expressão otimizada de proteínas recombinantes. Na Tabela 7 estão descritas as linhagens utilizadas.

3.6.2 Transformação das linhagens para expressão de proteínas recombinantes

Alíquotas de 40 μ L de células eletrocompetentes foram descongeladas a temperatura ambiente e colocadas imediatamente no gelo. A cada tubo foi adicionado 1 μ L de plasmídeo, incubando-se no gelo por 1 minuto. As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação (cubetas de 0,2 cm) foram: capacitância, 25 μ F; resistor, 200 $m\Omega$; e voltagem, 2,5 kV. A suspensão de células foi transferida para a cubeta de eletroporação gelada, colocada na câmara do eletroporador GenePulser XCell[®] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) (Figura 10) e o pulso elétrico foi gerado. Após o pulso, a cubeta foi imediatamente retirada da câmara e as células foram coletadas com 1 mL de meio SOC (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%, peso/volume; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; glicose 20 mM). A suspensão foi transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37°C por uma hora e então plaqueada em meio LB sólido contendo 100 μ g/mL de ampicilina (linhagens de *E. coli* BI21 DE3, *E. coli* BI21 DE3 SI), ou contendo ampicilina e cloranfenicol (100 μ g/mL e 50 μ g/mL, respectivamente (linhagens de *E. coli* BI21 DE3 pLysS) (Sambrook & Russell, 2001).

3.6.3 Expressão das proteínas recombinantes aSFPr-6xHis e OPNr-6xHis em pequena escala

Os clones transformantes foram expandidos em 2 mL de meio LB com as concentrações de antimicrobianos necessárias para cada linhagem, e cultivados por 16 a 18 horas, sob agitação a 37°C. Cada clone foi, então,

repicado com 1% (50 μ L) de pré-inóculo em 5 mL de meio 2x YT (Tripton 1,6%; extrato de levedura 1%; NaCl 0,5%, peso/volume) com antimicrobiano, sob agitação (250 rpm) a 37°C. O crescimento do cultivo foi realizado até atingirem uma densidade ótica em 600 nm de aproximadamente 0,6 (absorbância da cultura/absorbância do meio). Para induzir a expressão, foi adicionado IPTG (isopropiltiogalactosídeo, indutor de expressão de genes com promotor *lacT7*) na concentração final de 1,0 mM em todas as linhagens, exceto em *E. coli* BL21 DE3 SI, cuja expressão foi induzida por 0,2 e 0,3 M de NaCl. O cultivo foi mantido por 36 horas, para posterior análise de expressão através de SDS-PAGE nos tempos 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 horas. Como controle, o mesmo experimento foi realizado com células transformadas com pET23a(+), ou seja, plasmídeo sem inserto para síntese de aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis.



FIGURA 10 – Eletroporador GenePulser XCell®

Para cada tempo avaliado, foi retirada alíquota de 200 μ L de cultura, sendo essa transferida para tubos de microcentrífuga que foram centrifugados por 30 segundos a 12.000 rpm. As células foram ressuspensas no mesmo volume de solução salina a 4 °C (0,9% NaCl) e novamente centrifugadas nas

mesmas condições. O precipitado foi identificado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 7 – Linhagens de *E. coli* para expressão de proteínas recombinantes

Linhagem	Genótipo
BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3)</i>
BL21 (DE3) pLysS	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) pLysS (cm^R)</i>
BL21 (DE3) STAR	<i>F⁻, ompT, hsdSB(r_B⁻ m_B⁻), dcm, gal, nre131,) λ (DE3)</i>
BL21 (DE3) CodonPlus-RIL	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) argU, ileY, leuW</i>
BL21 SI	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3), polimerase de T7 indutível por NaCl</i>

3.6.4 Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Géis verticais de poliacrilamida para eletroforese das proteínas foram preparados entre duas placas de vidro do sistema Mini-PROTEAN[®] (Bio-Rad) (Figura 11). O gel de corrida 14% foi composto de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29% de acrilamida e 1% de bis-acrilamida), Tris 0,37 M pH 8,8, SDS 0,1%, 20 μL de persulfato de amônio 10% e 6 μL de TEMED, em volume total de 5 mL. O gel de entrada consistia em acrilamida 4%, bis acrilamida 0,1%, Tris 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, 20 μL de persulfato de amônio 10% e 3 μL de TEMED, em um volume total de 2,5 mL. As amostras foram diluídas em tampão de aplicação 5X (Tris 1,562 M pH 6,8, glicerol 25%, SDS 7%, 2-mercaptoetanol 12%, azul de bromofenol 0,25%) e incubadas a 100°C por 5 minutos. Aplicavam-se as amostras no gel já submerso no tampão de corrida (1,44% de glicina, 0,3% de Tris e SDS 0,01%) (Laemmli, 1970). A

corrida teve uma duração aproximada de 2 horas, com voltagem máxima 120 V fornecida por fonte de energia Life Technologies modelo 250.

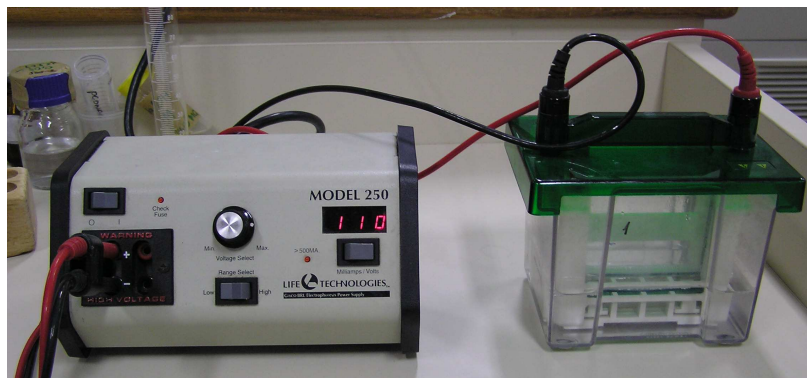


FIGURA 11 – Sistema de Eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Posteriormente, os géis foram retirados do sistema, sendo corados com solução 0,1% de Coomassie Brilliant Blue 250-R (Saint Louis, EUA) por 20 minutos. A descoloração dos géis para visualização das bandas foi efetuada com solução de 57% de metanol e 3% de ácido acético.

De cada amostra foram aplicados 15 µg de proteína, sendo a quantificação de proteína na amostra realizada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.6.5 Análise da expressão das proteínas recombinantes

A identificação da expressão das proteínas recombinantes aSFP-6xHis e OPNr-6xHis foi realizada através da visualização do maior conteúdo protéico, com peso molecular aproximado ao das proteínas. A confirmação da expressão foi realizada através de Western-blot com anticorpo anti-HisTag (Invitrogen).

Após a corrida de eletroforese, o gel de acrilamida foi colocado no sistema de transferência em contato com uma membrana de nitrocelulose (Millipore, Bilerica, EUA), ambos entre papéis filtro Watman nº3. O sistema foi colocado em uma cuba de transferência Trans-Blot (Bio-Rad) (Figura 12), sendo esta preenchida com tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%). A eletrotransferência foi realizada em câmara fria com 300 mA de corrente por 60 minutos. Após, a membrana foi incubada com M-TPBS (tampão PBS, adicionado de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado) por 60 minutos. Esta etapa visou o bloqueio da membrana, impedindo a fixação de proteínas na mesma em regiões não preenchidas na fase de eletrotransferência. A imunodeteção das proteínas recombinantes foi realizada com a incubação do anticorpo primário anti-HisTag (Invitrogen) por 12 a 16 horas, na concentração de 1:10.000 diluído em M-T-PBS. Após este período, o anticorpo primário foi retirado e a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com T-PBS. Incubou-se por 2 horas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase [anti-igG de camundongo (Amershan Pharmacia), concentração 1:3.000 diluído em M-T-PBS]. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada cinco vezes com T-PBS.

Para visualização das bandas, foi utilizado o método de ECL (Enhanced Chemiluminescence) (Millipore, Bilerica, EUA). Este método baseia-se na ação da peroxidase (conjugada no anticorpo secundário) no luminol presente nos reagentes de ECL. O resultado é a liberação de fótons que marca filmes de raio-X, possibilitando a identificação de bandas específicas.

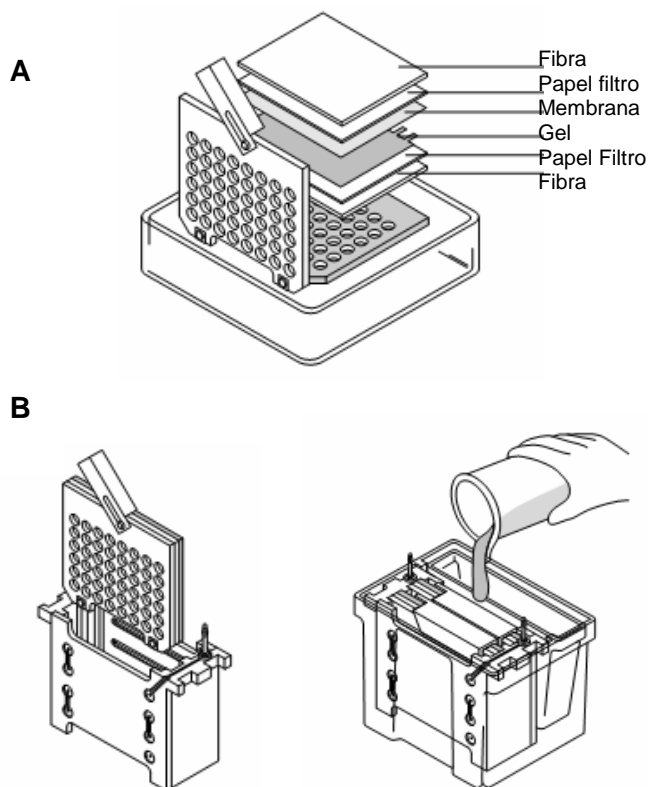


FIGURA 12 – Eletrotransferência (*western-blotting*). A – seqüência de montagem do sanduíche de transferência. B – Colocação do sistema da cuba e preenchimento com tampão de transferência.

3.6.6 Otimização das condições de cultivo e expressão

Para a produção de grande quantidade de proteína recombinante, as condições de cultivo e expressão foram adaptadas a partir do protocolo padrão. Testes de expressão foram realizados com gradual aumento de volume de meio de cultura e concentração de indutores de expressão. Outras variáveis como temperatura e rotação foram testadas, uma vez que os métodos de expressão de proteínas recombinantes não possuem condições fixas. Tais condições foram ajustadas para cada proteína.

3.7 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade

Para a purificação da aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis foram utilizados o “Ni-NTA Purification System” (Invitrogen) e o His-Select (Sigma) (Invitrogen, 2006a). Estes sistemas são específicos para purificação de proteínas recombinantes fusionadas com His-Tag e são baseados na alta afinidade e seletividade por proteínas fusionadas com cauda de poli-histidina. A coluna de purificação é constituída de níquel ligado ao ácido nitrilotriacético, associada a uma matriz de agarose a 6%.

Devido a características intrínsecas de cada proteína recombinante produzida, o fabricante recomenda a adaptação dos protocolos de purificação para melhor eficiência do processo (Invitrogen, 2006a).

3.7.1 Lise bacteriana e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes

As culturas bacterianas que expressaram a proteína recombinante foram centrifugadas (800 rpm por 1 minuto), e o precipitado ressuspendido em solução salina e novamente centrifugado. Após, as células foram lisadas em duas etapas: (1) o precipitado bacteriano foi ressuspendido em tampão de ligação (purificação nativa: NaH₂PO₄ 50 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0; purificação desnaturante e híbrida: NaH₂PO₄ 50 mM 8 M de uréia, pH 8,0), sendo acrescido 1 mg/mL de lisozima para a digestão da parede bacteriana. A reação foi incubada em gelo por 30 minutos; (2) A amostra sofreu lise física por sonicação com intensidade média (6 pulsos de 10 segundos, com intervalos de 10 segundos). A amostra foi centrifugada por 30 minutos, 15.000 rpm a 4 °C. O

sobrenadante foi transferido para outro tubo, e o precipitado foi restaurado ao volume anterior usando tampão de lise (Sambrook & Russell, 2001).

Ambas as frações, sobrenadante e precipitado, foram identificadas por SDS-PAGE e western blotting para determinação da solubilidade da proteína recombinante, isto é, se a proteína estava presente ou não no sobrenadante. A solubilidade das proteínas determinou o protocolo de purificação que foi adotado em cada caso.

3.7.2 Purificação em pequena escala

Para testar a eficiência da purificação, testes em pequena escala com 1 mL de cultura bacteriana com expressão da proteína recombinante induzida foram realizados para determinar as melhores condições de aplicação do método. Foram testados os protocolos de purificação nativa, desnaturante e híbrido (Invitrogen, 2006a).

3.7.2.1 Protocolo de purificação nativa

Em 1 mL de sobrenadante de cultura bacteriana lisada, foram acrescentados 50 μ L de resina Ni-NTA previamente lavada no tampão de ligação (descrito anteriormente). A mistura permaneceu sob leve agitação por 60 minutos à temperatura ambiente para a ligação da proteína recombinante ao níquel da resina.

Posteriormente, a mistura foi centrifugada rapidamente para a precipitação da resina, sendo o sobrenadante retirado e armazenado para análise através de SDS-PAGE.

A resina foi ressuspensa em 500 μ L de tampão de lavagem (50 mM NaH_2PO_4 , 20 mM de imidazol, pH 8,0), sob agitação, por 5 minutos. Essa mistura foi centrifugada e o sobrenadante armazenado para análise. Este processo foi repetido mais três vezes para retirar o máximo possível de proteínas não ligadas à resina de Ni-NTA.

Após as lavagens, a resina foi ressuspensa em tampão de eluição (50 mM NaH_2PO_4 , 20 mM de imidazol, pH 8,0), permanecendo sob agitação leve por 10 minutos. Novamente a mistura foi centrifugada rapidamente para precipitação da resina, sendo o sobrenadante retirado e armazenado para análise através de SDS-PAGE. Este processo foi repetido mais uma vez (Invitrogen, 2006a).

3.7.2.2 Protocolo de purificação desnaturante

Este protocolo segue os mesmos passos como descrito na seção 3.7.2.1, porém utilizando-se o precipitado da cultura bacteriana lisada. Todos os tampões foram constituídos de NaH_2PO_4 50 mM e uréia 8 M, com os seguintes valores de pH: tampão de ligação pH 8,0; tampões de lavagem: pH 6,0 e 5,3; e tampão de eluição: pH 4,5 (Invitrogen, 2006a). A uréia nesta concentração é responsável pela solubilização dos corpos de inclusão formados na expressão insolúvel. Após a purificação, foi realizado um pool com as frações de purificação, sendo este concentrado em tubo tipo Centricon com 3 kDa de poro para concentração da proteína e remoção da uréia.

3.7.2.3 Protocolo de purificação híbrida

O objetivo da purificação híbrida foi a utilização da uréia a 8 M para solubilização dos corpos de inclusão na fase de ligação e primeiras lavagens da coluna. Na segunda etapa, utilizou-se tampões sem uréia para permitir a renaturação e remodelamento da proteína recombinante na coluna, e subsequente eluição sem uréia utilizando 250 mM de imidazol (Carrio & Villaverde, 2001; Jungbauer et al., 2004).

3.7.3 Purificação em maior escala

Definidas as melhores condições para eluição da proteína, o protocolo de purificação foi ajustado para ser realizado em colunas fechadas ou abertas. A melhor condição de ligação e eluição foi validada. Para estes experimentos foram utilizadas as resinas de níquel Ni-NTA (Invitrogen) e His Select (Sigma), usadas em colunas abertas modelo Econo-Pac (Bio-Rad).

Para os ensaios em maior escala, foram utilizados 1 mL de leite, sendo usado para cada lavagem volumes de 3 a 6 vezes o volume de resina. Nas etapas de eluição foram utilizados 1 mL de tampão de eluição, por etapa, sendo o eluato aliquoteado em frações de 500 µL.

3.8 Análise e simulação de experimentos *in silico*

Atualmente encontram-se disponíveis diversos softwares para análise e simulação de experimentos para aplicação em praticamente todas as etapas de clonagem gênica. O uso destes softwares permite avaliar, conferir e redesenhar estratégias de construção de vetores. Os softwares usados ao longo deste trabalho foram:

- *CLC Sequence Viewer 6.1*: Este software permite a visualização e a edição de seqüências de DNA, RNA e proteínas, bem como o alinhamento entre várias seqüências e a simulação de mecanismos de transcrição e tradução (Figura 13).

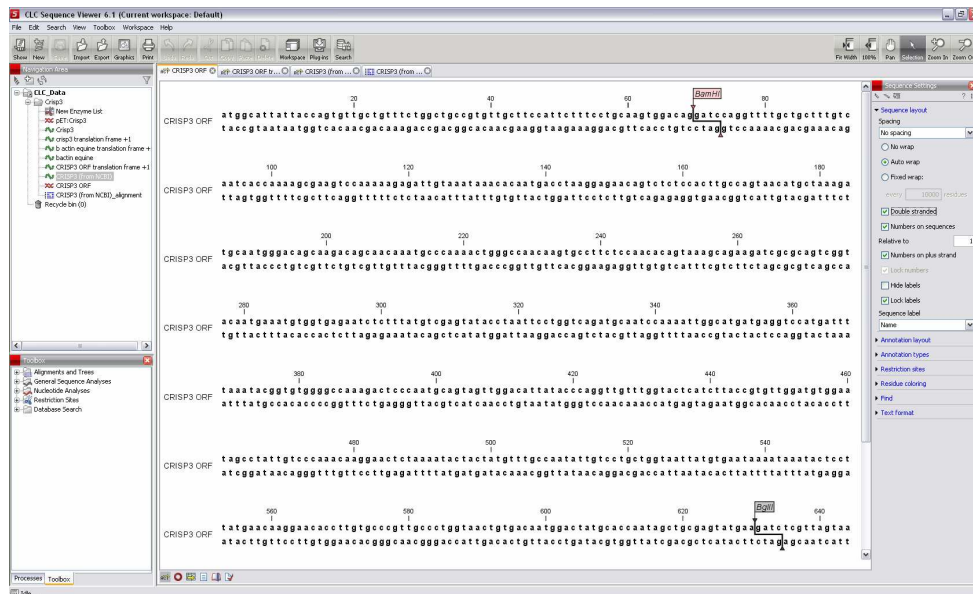


FIGURA 13 – Tela da área de trabalho do software CLC Sequence Viewer 6.1.

- *pDRAW32 1.0*: Poderosa ferramenta para construção *in silico* de plasmídios, permitindo editar sua seqüência e simular ensaios com enzimas de restrição e experimentos de eletroforese de DNA e RNA em gel de agarose (Figura 14).

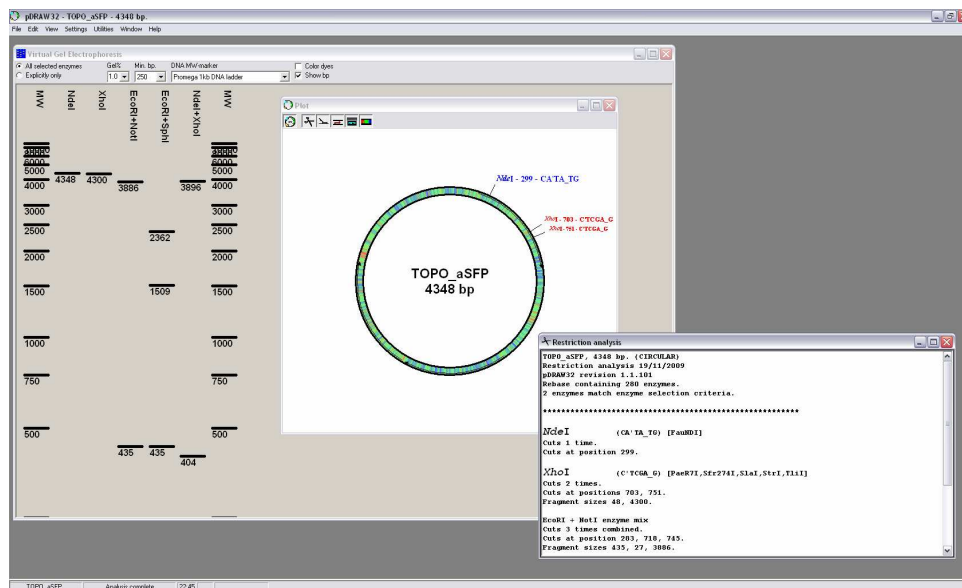


FIGURA 14 – Tela da área de trabalho do software pDRAW32 1.0.

- *Chromas 2.33*: Software para avaliação dos cromatogramas obtidos com o seqüenciamento dos vetores construídos. Permite uma análise criteriosa das seqüências, possibilitando uma interpretação apropriada dos dados brutos gerados no seqüenciamento (Figura 15).

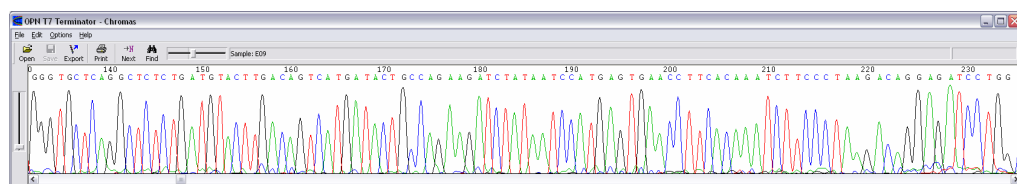


FIGURA 15 – Tela da área de trabalho do software Chromas 2.33.

- *BLAST (Basic Local alignment Search Tool)*: Software online que permite o alinhamento de seqüências através de diversos banco de dados genômicos e protéicos (Figura 16). Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

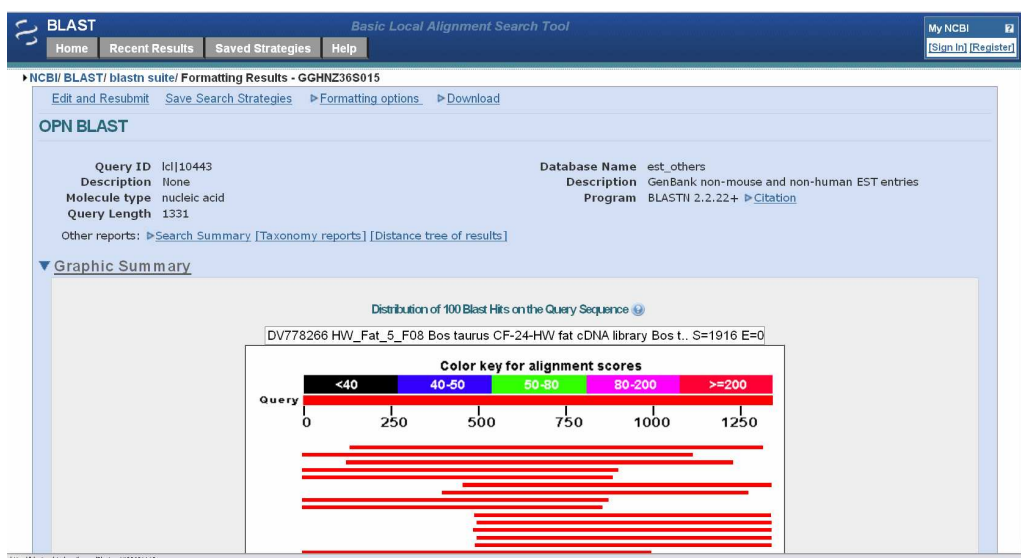


FIGURA 16 – Tela da área de trabalho do software online BLAST.

- *Prime3Plus*: Software online para auxílio no desenho de primers. Oferece diversas ferramentas que auxiliam a escolha da melhor região, considerando também importantes fatores como temperatura de anelamento e conteúdo de nucleotídeos G+C (Figura 17). Disponível em <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.

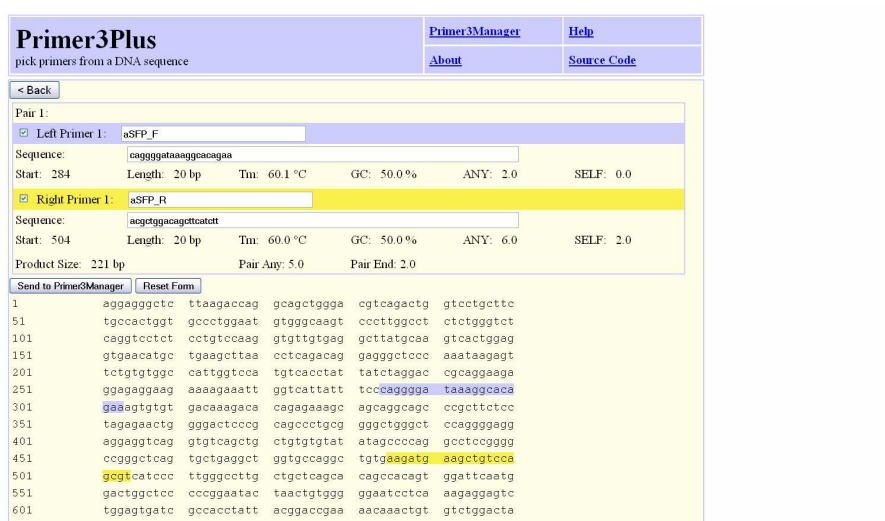


FIGURA 17 – Tela da área de trabalho do software online Primer3Plus.

- *IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1*: Poderosa ferramenta online para avaliação dos *primers* desenhados. Fornece diversas informações sobre os primers avaliados, permitindo a simulação de reações de PCR objetivando testar as possíveis formações de *hairpins*, homodímeros e heterodímeros, ligação entre os *primers* que diminuem a eficiência da reação de amplificação (Figura 18). Disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

The screenshot displays the IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1 web application. The main interface includes a sequence input field containing the sequence 5'-CTG CAT ATG AAG CTG TCC AGC GTC A-3'. Below this field are buttons for 'Clear Sequence' and 'Add To Order'. To the right, there are input fields for 'Oligo Conc' (0.25 µM), 'Na⁺ Conc' (50 mM), 'Mg⁺⁺ Conc' (0 mM), and 'dNTPs Conc' (0 mM). A 'Target Type' dropdown is set to 'DNA'. A vertical column of buttons on the right includes 'Analyze', 'Hairpin', 'Self-Dimer', 'Hetero-Dimer', 'NCBI Blast', 'TM Mismatch', and 'LBA Conversion'. The 'Results' section is expanded, showing the following data: SEQUENCE: 5'-CTG CAT ATG AAG CTG TCC AGC GTC A-3'; COMPLEMENT: 5'-TGA CGC TGG ACA GCT TCA TAT GGA C-3'; LENGTH: 25; GC CONTENT: 52.0%; MELT TEMP: 60.7 °C; MOLECULAR WEIGHT: 7642.0 g/mole. A sidebar on the right features a box for 'CDC H1N1 DETECTION OLIGOS primers, probes, positive controls for research use only' with a note: 'For research use only. Not licensed, approved or sold for use in diagnostics.'

FIGURA 18 – Tela da área de trabalho do software online IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1.

4. RESULTADOS

4.1 Criação da biblioteca de cDNA

O conteúdo de RNA foi isolado das amostras de tecido reprodutivo provenientes de abatedouro, este foi transcrito para cDNA através da técnica de RT-PCR. Para confirmação e avaliação da construção correta das bibliotecas de cDNA, foi realizada a técnica de PCR utilizando-se *primers* para a amplificação do cDNA da β -actina (Figura 19). Os tecidos utilizados foram próstata, vesícula seminal, glândula bulbo-uretral, ampola e testículo, uma vez que nesses locais foram descritas as proteínas a serem avaliadas nesse estudo. A amplificação do fragmento de β -actina confirmou a construção correta da biblioteca de cDNA nas amostras 1, 2, 3, 5, 6 e 7.

4.2 Obtenção dos genes codificadores das proteínas aSFP e OPN

Foi realizada a reação de PCR utilizando os *primers* aSFP#1 e aSFP#2, e OPN#1 e OPN#2 para amplificação das seqüências de cDNA codificantes para as proteínas aSFP e OPN (Figura 20).

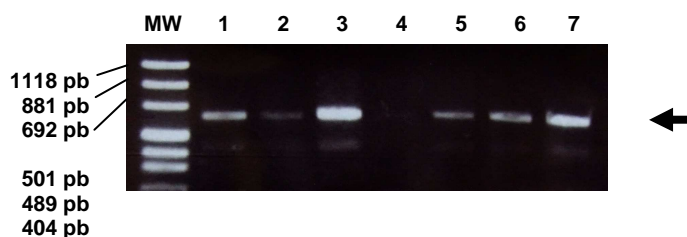


FIGURA 19 – Amplificação do cDNA para β -actina para confirmação da criação de biblioteca de cDNA. Linhas MW - Marcador de peso molecular. 1 – próstata (animal 1); 2 – glândula bulbo-uretral (animal 2); 3 – testículo (animal 3); 4 - glândula bulbo-uretral (animal 3); 5 – vesícula seminal (animal 3); 6 – ampola (animal 3) e 7 – próstata (animal 3). A seta indica o fragmento amplificado. Gel de agarose 1% corado com EtBr observado sob luz ultravioleta.

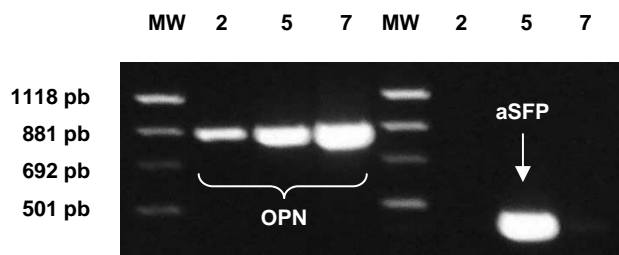


FIGURA 20 - Produtos de PCR dos cDNA para aSFP e OPN, Linhas: MW - Marcador de peso molecular. 2 – glândula bulbo-uretral (animal 2); 5 – vesícula seminal (animal 3) e 7 – próstata (animal 3). As setas indicam os fragmentos amplificados. Gel de agarose 1% corado com EtBr observado sob luz ultravioleta.

A melhor amplificação de cDNA da OPN (fragmento de 848 pb) foi encontrada a partir da biblioteca de cDNA de próstata. O cDNA da aSFP (fragmento de 416 pb) foi amplificado eficientemente a partir da amostra de vesícula seminal. Essas amostras foram utilizadas nos experimentos seguintes.

4.3 Clonagem em vetor pCR[®]2.1-TOPO

Para obtenção das seqüências com as extremidades coesivas para a ligação no vetor de expressão, os produtos de PCR foram clonados em pCR[®]2.1-TOPO. Após transformação em *E. coli* TOP10 e cultivo, foram selecionados dez clones bacterianos que cresceram em meio seletivo (resistência a ampicilina) e não apresentaram coloração azul (clivagem de X-gal presente no meio). Posteriormente, fez-se o isolamento dos plasmídeos destes clones por Miniprep, e realizou-se o tratamento com endonuclease de restrição *EcoRI*, para confirmação da ligação (Figura 21 e 22). O *screening* para clones pTOPO-aSFP mostrou 100% de eficiência (Figura 21). Já para pTOPO-OPN apenas 6 clones apresentaram o perfil eletroforético esperado (Figura 22). A partir desses resultados foram escolhidos arbitrariamente os clones A7 e O3 para os experimentos seguintes.

4.4 Construção dos plasmídeos pET-aSFP e pET-OPN

Utilizando-se o tratamento com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* nos plasmídeos pTOPO-OPN e pTOPO-aSFP, as seqüências codificantes para OPN e aSFP, respectivamente, foram retiradas dos vetores. Os fragmentos foram separados através de eletroforese (Figura 23) e as bandas contendo os fragmentos de cDNA foram extraídas do gel de agarose. Da mesma forma, o plasmídeo pET23a(+) foi tratado com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, retirando-se, assim, parte do seu sítio múltiplo de clonagem.

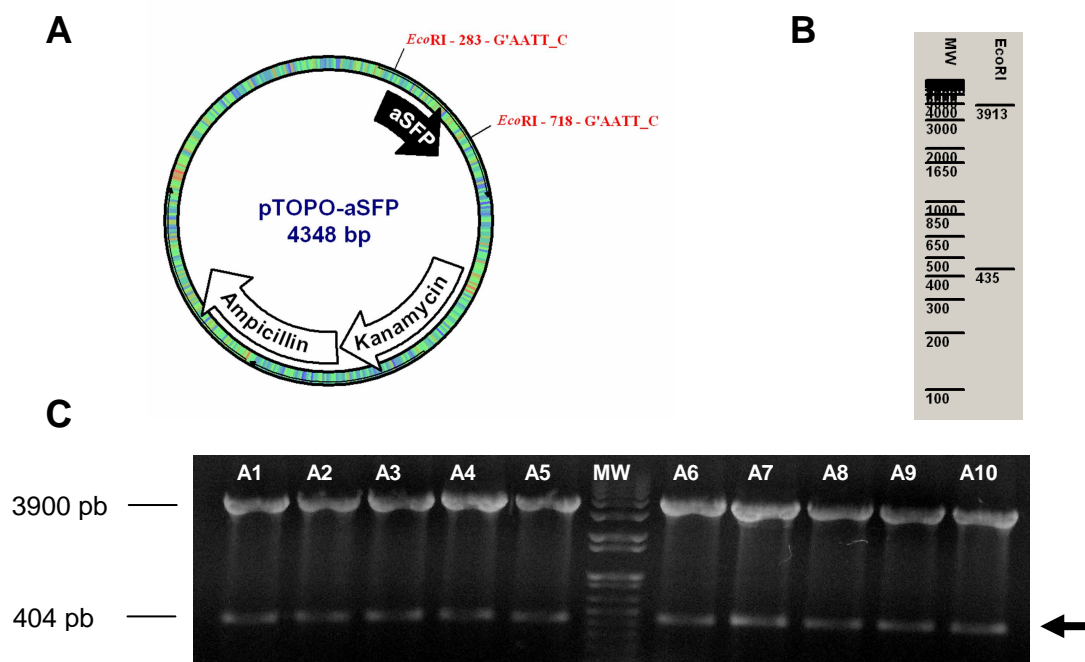


FIGURA 21 – Análise do vetor pTOPO-aSFP. A: Representação esquemática do pTOPO-aSFP; em destaque o inserto clonado (seta preta) e os sítios de restrição para *EcoRI* (em vermelho). B: Simulação do gel de agarose da análise de restrição de pTOPO-aSFP com *EcoRI*. C: pTOPO-aSFP clivado com *EcoRI*. Os fragmentos de 3913 pb são o plasmídeo clivado, e os fragmentos de 435 pb (seta) são a região codificante para a aSFP. A1 a A10 são os diferentes clones isolados; MW é o padrão de peso molecular. Gel de agarose 1% corado com EtBr visualizado sob luz ultravioleta.

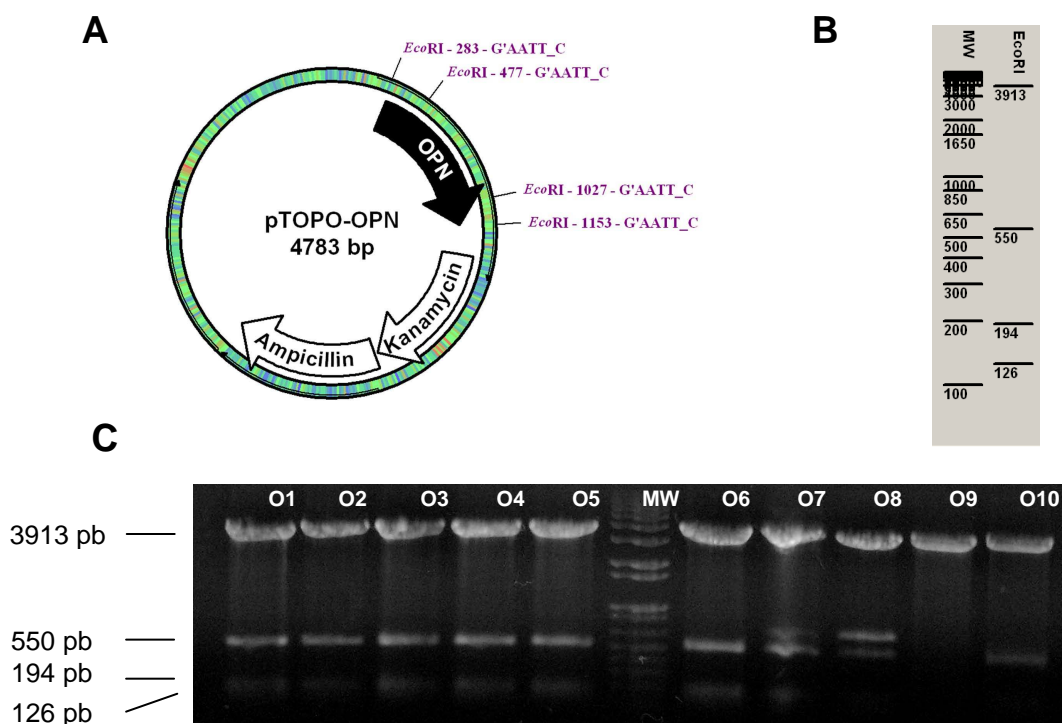


FIGURA 22 – Análise do vetor pTOPO-OPN. A: Representação esquemática do pTOPO-OPN; em destaque o inserto clonado (seta preta) e os sítios de restrição para *EcoRI* (em roxo). B: Simulação do gel de agarose da análise de restrição de pTOPO-OPN com *EcoRI*. C: pTOPO-OPN clivado com *EcoRI*. Os fragmentos de 3913 pb são o plasmídeo clivado, e os fragmentos de 550 pb, 194 pb e 126 pb são resultados da presença de 2 sítios de clivagem dentro da região codificante para OPN. O1 a O10 são os diferentes clones isolados; MW é o padrão de peso molecular. Gel de agarose 1% corado com EtBr observado sob luz ultravioleta.

Após a ligação dos insertos ao plasmídeo pET23a(+) e transformação das bactérias, os clones resultantes tiveram seu DNA plasmidial purificado e analisado através de ensaio de restrição e PCR.

Em um primeiro momento, os clones recombinantes foram analisados por restrição simples, ou seja, clivando-se com apenas uma enzima e comparando-se os padrões eletroforéticos contra as amostras não clivadas (Figura 24). Após esta seleção, somente os clones que apresentaram os fragmentos esperados foram novamente analisados por clivagem dupla e PCR utilizando primers que anelam nas regiões que flanqueiam o inserto clonado. Para isto, foram usados os primers T7 Promoter e T7 Terminator (Figura 25).

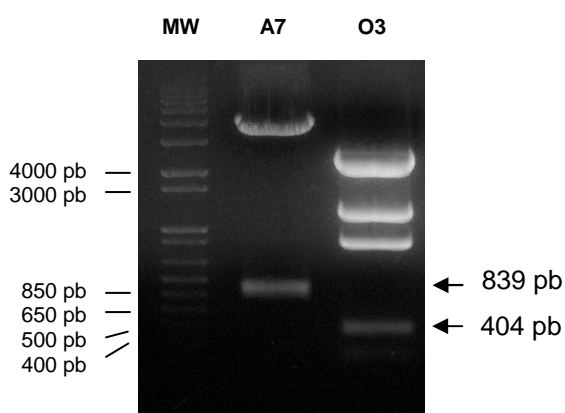


FIGURA 23 – Clivagem dos clones A7 (pTOPO-aSFP) e O3 (pTOPO-OPN) com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. Gel de agarose 2% corado com EtBr observado sob luz ultravioleta.

Baseado nos resultados de análise de restrição e PCR, os plasmídeos dos clones A10 e O3 foram seqüenciados, e a confirmação da correta construção dos plasmídeos pET-aSFP e pET-OPN (Figuras 26 e 27,

respectivamente), foi realizada através de análise *in silico* utilizando-se os softwares Chromas e CLC Sequence Viewer.

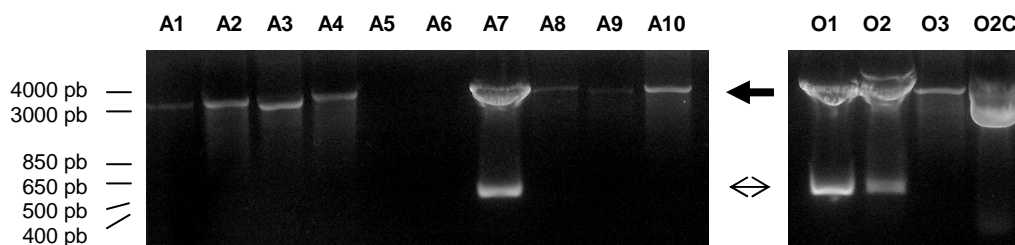


FIGURA 24 – Análise dos clones resultantes da clonagem dos genes em pET. O padrão de uma banda linear, fina e definida (seta cheia) caracteriza o plasmídeo clivado em um único ponto (esperado) (A1 a A4, A8 a A10; O3). Mais de um fragmento (seta vazia) caracteriza clonagem não específica (A7; O1 e O2). Amostras A5 e A6 não apresentavam quantidade de DNA visível. O2C é o controle não clivado. Gel de agarose 1,5% corado com EtBr observado sob luz ultravioleta.

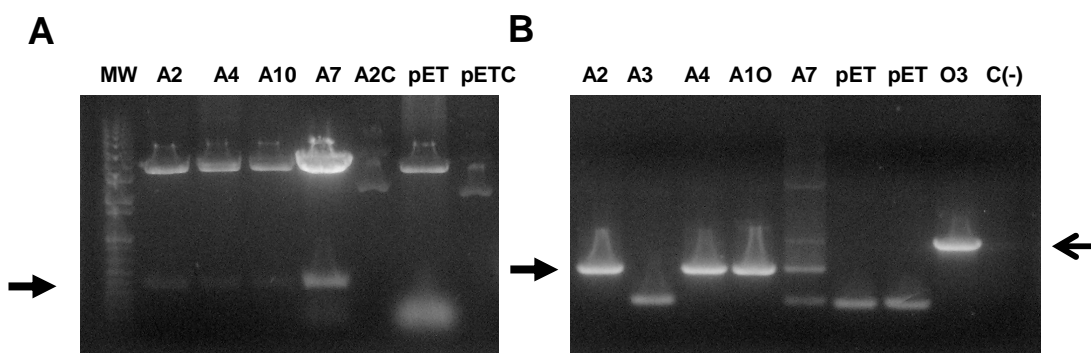


FIGURA 25 – Análise de restrição e PCR de clones recombinantes. A: Clivagem com *NdeI* e *XhoI* dos clones A2, A4, A7 e A10, e pET23a(+) vazio. Como controle de padrão de corrida, foram aplicados o clone A2 (A2C) e pET23a(+) (pETC) não clivados. A seta mostra o fragmento esperado de 404 pb. B: Reação de PCR usando os primers T7 Promoter e T7 Terminator. Os clones A2, A4 e A10 apresentaram amplificação de fragmento de 539 pb (seta cheia), confirmando a clonagem correta do pET-aSFP. A3 é o controle negativo, pET é o vetor vazio e C(-) é o controle sem amostra de DNA. O3 apresentou a banda esperada de 974 pb (seta vazia), confirmando a correta construção do plasmídeo pET-OPN. Gel de agarose 1% corado com EtBr observado sob luz ultravioleta.

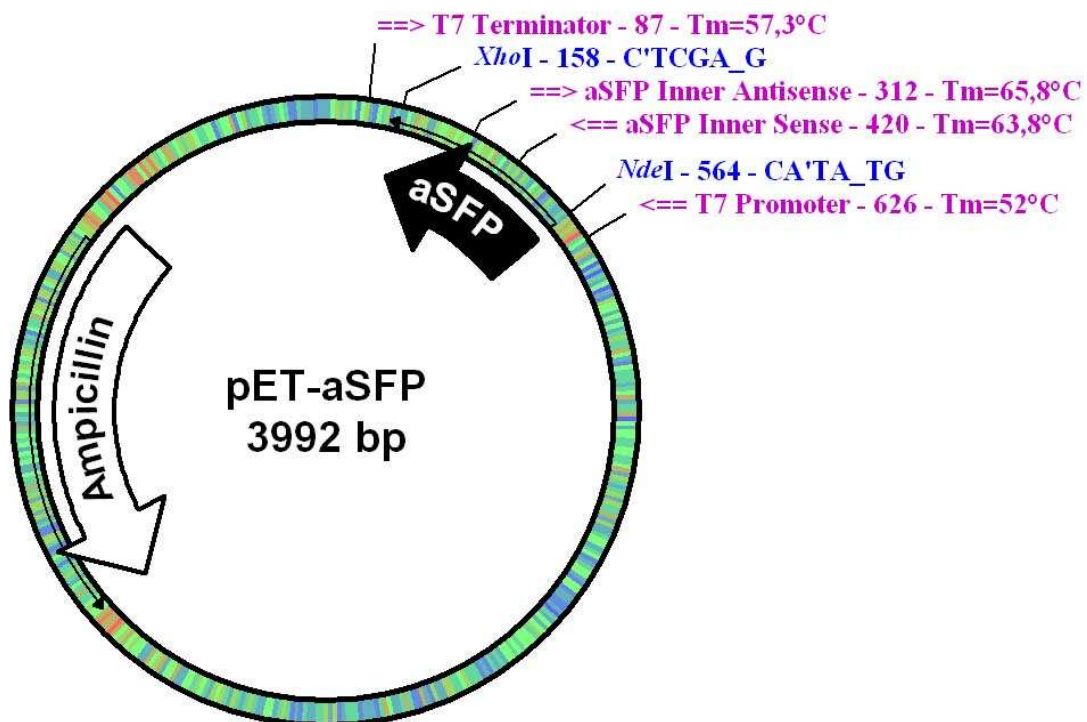


FIGURA 26 – Representação esquemática do plasmídeo pET-aSFP. Em destaque estão os principais componentes do plasmídeo: fragmento referente ao cDNA da aSFP (seta preta); gene de resistência à ampicilina (seta branca); regiões de anelamento de primers para seqüenciamento e sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI*.

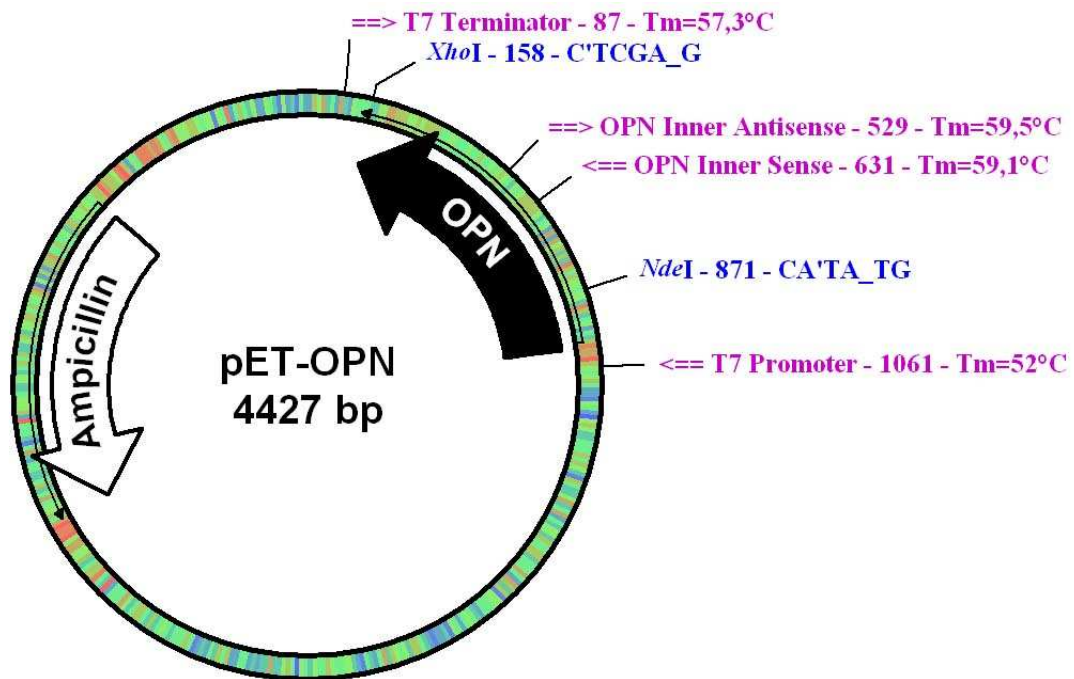


FIGURA 27 – Representação esquemática do plasmídeo pET-OPN. Em destaque estão os principais componentes do plasmídeo: fragmento referente ao cDNA da OPN (seta preta); gene de resistência à ampicilina (seta branca); regiões de anelamento de primers para seqüenciamento e sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI*.

4.5 Testes de expressão de aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis

As expressões recombinantes de aSFP e OPN foram amplamente avaliadas em diferentes linhagens de *E. coli* e com diferentes características de cultivo e indução. Não existem fórmulas para a expressão de proteínas recombinantes, sendo necessário buscar o melhor protocolo para cada proteína alvo. Neste sentido, foram testadas diferentes concentrações de IPTG, tempos e temperaturas de indução. Abaixo, estão arrolados os dados mais representativos.

4.5.1 Linhagens de *E. coli* que não expressaram aSFP r -6xHis

Não foram obtidas a expressão da aSFP recombinante nas linhagens *E. coli* BL21 DE3 (Figura 28), BL21 SI (Figuras 29 e 30), BL21 Codon Plus e BL21 Star.

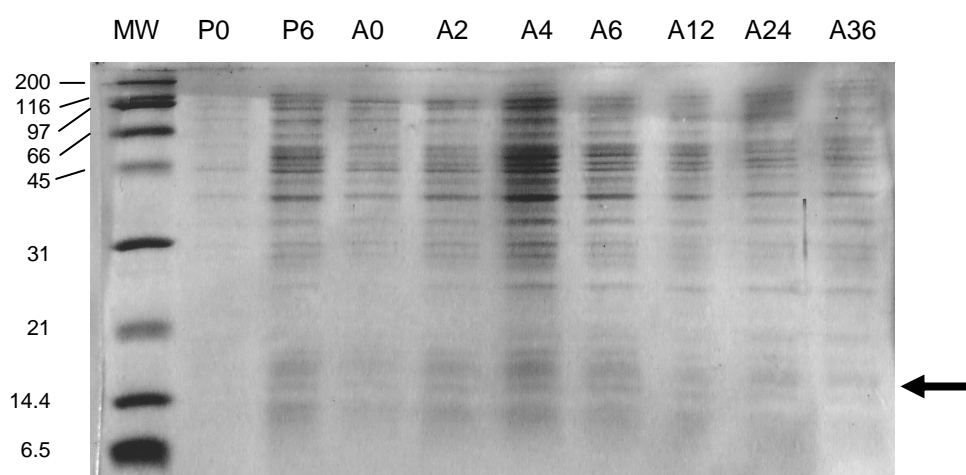


FIGURA 28 – Teste de expressão de aSFP r -6xHis em *E. coli* BL21 DE3 induzida com 1 mM de IPTG. P0 e P6 – Controle [bactéria transformada com pET23a(+)] com 0 e 6 horas de cultivo induzido; A0 a A36 – Tratamento com 0 a 36 horas de cultivo. MW – Padrão de peso molecular em kDa. Eletroforese em gel SDS-PAGE 14%.

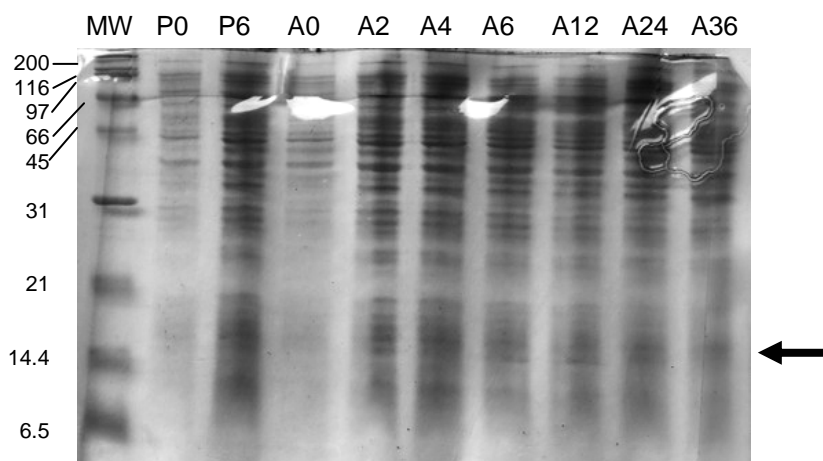


FIGURA 29 – Teste de expressão de aSFPr-6xHis em *E. coli* BL21 SI induzida com 300 mM de NaCl. P0 e P6 – Controle [bactéria transformada com pET23a(+)] com 0 e 6 horas de cultivo induzido; A0 a A36 – Tratamento com 0 a 36 horas de cultivo. MW – Padrão de peso molecular em kDa. Eletroforese em gel SDS-PAGE 14%.

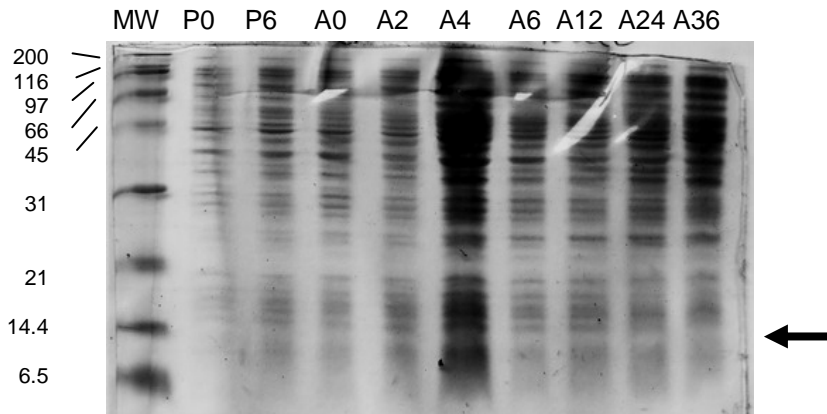


FIGURA 30 – Teste de expressão de aSFPr-6xHis em *E. coli* BL21 SI induzida com 200 mM de NaCl. P0 e P6 – Controle [bactéria transformada com pET23a(+)] com 0 e 6 horas de cultivo induzido; A0 a A36 – Tratamento com 0 a 36 horas de cultivo. MW – Padrão de peso molecular em kDa. Eletroforese em gel SDS-PAGE 14%.

4.5.2 Expressão de aSFPr-6xHis em *E. coli* BL21 DE3 pLysS

Utilizando a cepa de *E. coli* BL21 DE3 pLysS foi identificada uma banda compatível com a superexpressão de aSFPr-6xHis após 3 horas de

indução com 0,5 mM de IPTG (Figura 31, linha 6). Observa-se uma nítida banda de superexpressão na linha 6, quando comparada com a banda de mesmo peso molecular na linha 4, seu controle negativo.

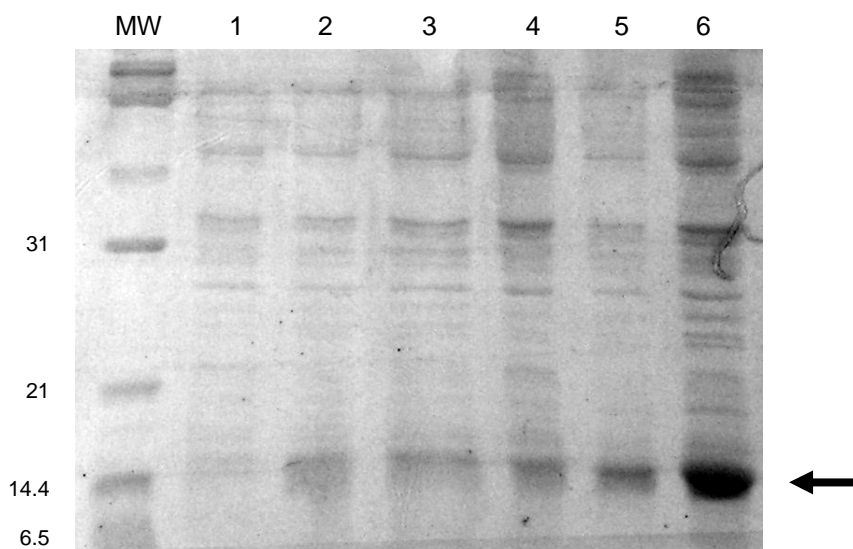


FIGURA 31 – Expressão da aSFP_r-6xHis em *E. coli* pLysS. Linhas: 1- não induzido (NI), 1 h; 2 - 1 mM IPTG, 1 h; 3 – 0,5 mM IPTG, 1h; 4 – NI, 3h; 5 – 1 mM IPTG, 3h; 6 - 0,5 mM IPTG 3h. MW – Padrão de peso molecular em kDa. Eletroforese em gel SDS-PAGE 14%

Para confirmar a expressão de aSFP_r-6xHis no clone isolado de *E. coli* BL21 DE3 pLysS, foi realizada a imunoidentificação com o anticorpo anti-HisTag. Como controles foram utilizados extratos da cultura bacteriana com o plasmídio vazio pET23a(+) e extrato de cultura de *E. coli* BL21 DE3 pLysS sem o plasmídio. Ambos foram induzidos a expressão com 0,5 mM de IPTG por 3h (Figura 32A).

A superexpressão de aSFP_r-6xHis foi caracterizada como insolúvel, pois apresentou maior concentração da proteína alvo no precipitado bacteriano

após lise e centrifugação (Figura 32B), resultado da formação de corpos de inclusão durante a expressão heteróloga.

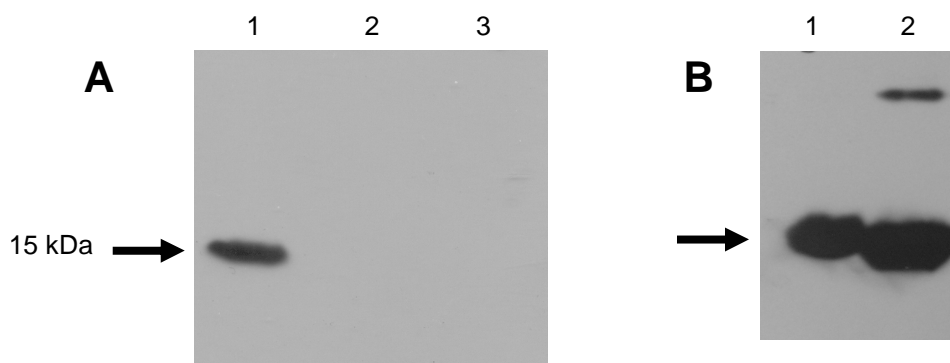


FIGURA 32 – Imunoidentificação de aSFP-6xHis. A: Banda relativa a aSFP-6xHis (seta), com aproximadamente 15 kDa. Linhas: 1- Extrato de bactéria com pET-aSFP; 2 – extrato de bactéria com pET23a(+); 3 – Extrato de bactéria sem plasmídeo. B: avaliação da solubilidade da aSFP-6xHis, a seta indica a marcação para aSFP-6xHis. Linhas: 1 – Sobrenadante do extrato bacteriano lisado (fração solúvel); 2 – Precipitado do extrato bacteriano lisado (fração insolúvel). *Western blotting* com anticorpo anti-histag em gel SDS-PAGE 14%.

4.5.3 Linhagens de *E. coli* que não expressaram OPN-6xHis

Não foi identificada expressão de OPN recombinante nas linhagens de *E. coli* BL21 DE3 (Figura 33), BL21 SI, BL21 Codon Plus (Figura 34) e BL21 Star (Figura 35). Variações no protocolo como tempo de indução, concentração de IPTG e temperatura do crescimento da cultura não foram eficientes para obtenção de expressão. A Figura 33 ilustra a repetição dos padrões de corrida obtidos em SDS-PAGE, evidenciando a não influência nas alterações de variáveis como tempo (1, 2 e 3 horas) e concentração de IPTG (0,5 e 1,0 mM). A expressão somente seria confirmada com o aparecimento de uma banda de peso molecular em torno de 45 kDa.

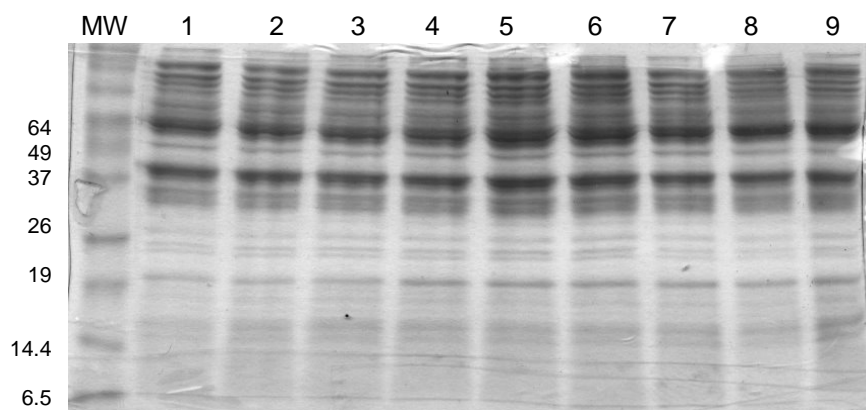


FIGURA 33 – Teste de expressão de OPNr-6xHis em *E. coli* BL21 DE3. 1 – Não induzido (NI), 1 h; 2 – indução com IPTG 1 mM, 1 h; 3 – indução com IPTG 0,5 mM, 1 h; 4 – NI, 2 h; 5 – indução com IPTG 1 mM, 2 h; 6 – indução com IPTG 0,5 mM, 2 h; 7 – NI, 3 h; 8 – indução com IPTG 1 mM, 3 h; 9 – indução com IPTG 0,5 mM, 3 h; MW – Padrão de peso molecular em kDa. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

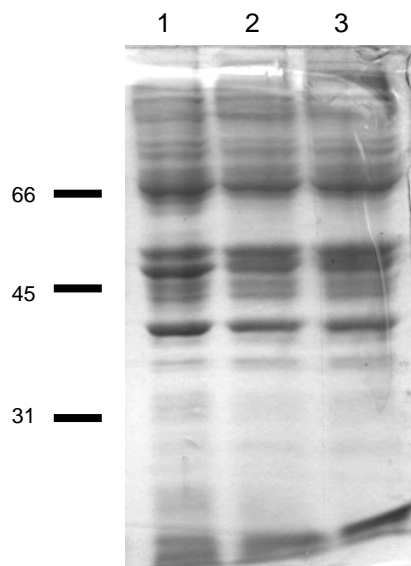


FIGURA 34 – Teste de expressão de OPNr-6xHis em *E. coli* BL21 Codon Plus. 1 – Não induzido (NI), 3 h; 2 – indução com IPTG 0,1 mM, 3 h; 3 – indução com IPTG 0,3 mM, 3 h. Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%.

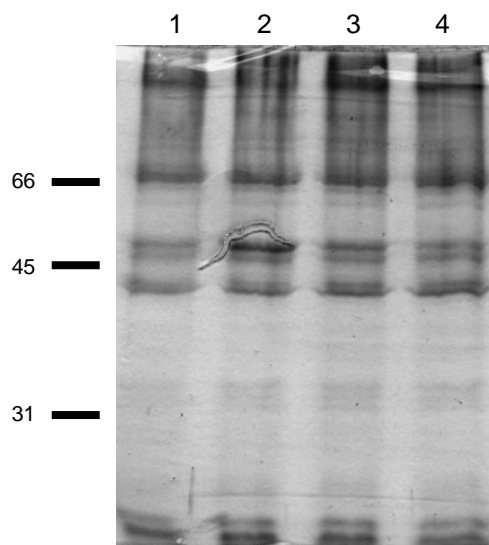


FIGURA 35 – Teste de expressão de OPNr-6xHis em *E. coli* BL21 Star 1 – Não induzido (NI), 3 h; 2 – indução com IPTG 0,1 mM, 3 h; 3 – indução com IPTG 0,3 mM, 3 h; 4 – indução com IPTG 0,5 mM, 3 h. Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%.

4.5.4 Expressão de OPNr-6xHis em *E. coli* BL21 DE3 pLysS

Foi detectada a expressão da OPN recombinante (banda de aproximadamente 45 kDa) na linhagem de *E. coli* BL21 DE3 pLysS, utilizando-se como condições de expressão 1 mM de IPTG em 3 horas de indução a 37°C. Porém, a expressão mostrou-se muito baixa, podendo ser identificada somente através de imunodeteção (Figura 37). Em virtude da baixa eficiência - vide a não diferença entre os padrões de corridas demonstrados na Figura 36 - diversas estratégias de otimização foram testadas, como ampla concentração de IPTG e diferentes temperaturas (22°C, 30°C, 33°C). Da mesma forma, foram testados 10 clones diferentes de *E. coli* BL21 pLysS transformada com pET-OPN, porém sem melhora na eficiência de expressão. A presença de OPNr-6xHis foi identificada tanto na fração solúvel, quanto na insolúvel (Figura

37).

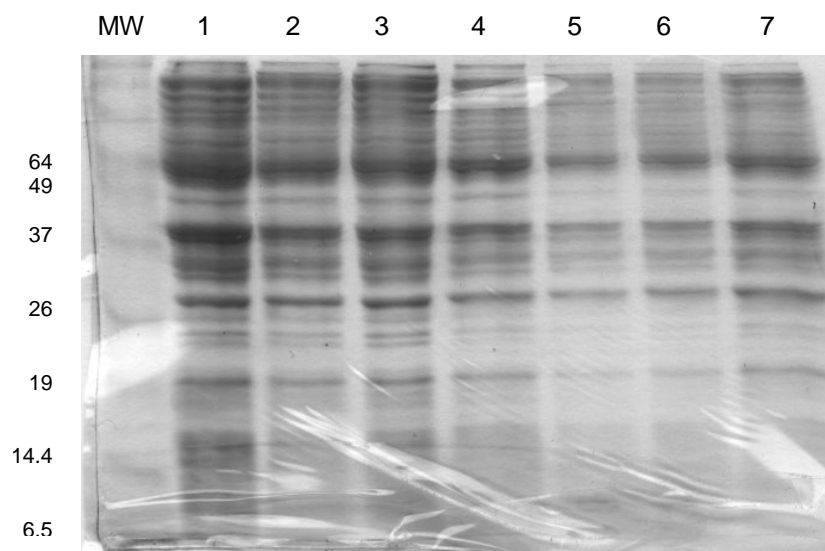


FIGURA 36 – Teste de expressão de OPNr-6xHis em *E. coli* BL21 pLysS. 1 – Não induzido (NI), 3 h; 2 – indução com IPTG 1 mM, 3 h; 3 – indução com IPTG 0,5 mM, 3 h; 4 – NI, 3 h; 5 – indução com IPTG 0,1 mM, 3 h; 6 – indução com IPTG 0,2 mM, 3 h; 7 – indução com IPTG 0,3 mM, 3 h; MW – Padrão de peso molecular em kDa. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

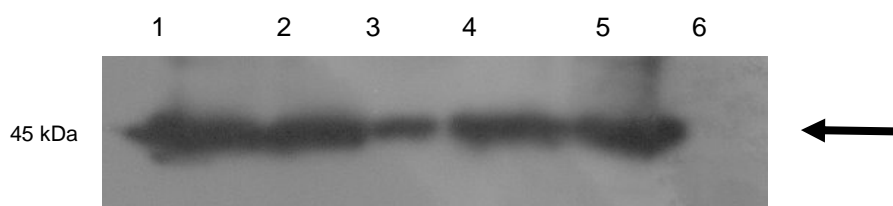


FIGURA 37 – Imunoidentificação de OPNr-6xHis e avaliação da solubilidade da proteína A: Banda relativa a OPNr-6xHis (seta), com aproximadamente 45 kDa. Linhas: 1 – fração solúvel; 2 – fração solúvel; 3 – fração insolúvel; 4 – fração insolúvel; 5 – Controle: extrato bacteriano não lisado; 6 – controle sem expressão (plasmídio vazio). *Western blotting* com anticorpo anti-histag em gel SDS-PAGE 14%.

4.6 Purificação das proteínas aSFP r -6xHis e OPN r -6xHis

4.6.1 Purificação da aSFP r -6xHis por cromatografia por afinidade

Devido às grandes chances das proteínas recombinantes sintetizadas como corpos de inclusão não possuírem atividade biológica, utilizamos o protocolo da purificação nativa, ou seja, a purificação sem o uso de agentes desnaturantes. Diversos protocolos foram testados visando otimizar a purificação, utilizando imidazole para lavagem da coluna em gradiente crescente de 0, 5, 10, 20, 50, 100 mM e para eluição da coluna nas concentrações de 100, 200 e 500 mM. Contudo, pouquíssima quantidade de proteína ligou-se ao níquel da coluna (Figura 38, linhas 6 e 7). Os resultados do *Wester blotting* mostraram uma grande perda de proteína no *flow-through* e ocorrendo logo nas primeiras lavagens (Figura 38, linhas 1 e 2).

Foi utilizado, também, um protocolo híbrido de purificação, que é iniciado utilizando-se uréia na etapa de ligação, para a dissociação das proteínas do corpo de inclusão. Durante a lavagem da coluna, a uréia é retirada gradualmente do sistema com a lavagem da resina e, finalmente, a proteína é eluída sem uréia. O objetivo deste método foi desfazer os corpos de inclusão presentes na fração insolúvel, promovendo sua ligação ao níquel. Durante a lavagem, a retirada da uréia poderia resultar no remodelamento da proteína na coluna. Porém, o resultado também não foi satisfatório (Figura 39). Uma maior quantidade de proteína ligou-se à resina, mas a eluição das proteínas apresentou diversos contaminantes do extrato protéico bacteriano. Foi testado

um maior volume de lavagem da resina antes da eluição, contudo as proteínas que apresentavam ligação inespecífica ao níquel só eram retiradas na etapa de eluição.

Como não foram atingidos resultados satisfatórios usando a fração solúvel, optou-se trabalhar com o precipitado da lise bacteriana (fração insolúvel). Com uma maior quantidade da proteína alvo, e auxiliada pela utilização de 8 M de uréia, foi obtido o melhor resultado de purificação. Com este protocolo, onde não é utilizado o imidazole e a eluição é realizada através de troca iônica, isto é, com a diminuição gradual do pH dos tampões de lavagem e eluição da coluna, obteve-se a melhor purificação de aSFP r -6xHis, utilizando o tampão com pH 4,5 e 150 μ L de resina de purificação (Figura 40). Como uma quantidade considerável de proteína alvo foi perdida no início da purificação, foi aumentada a quantidade de resina de níquel para garantir a melhor superfície de ligação para aSFP r -6xHis. Esta variação no protocolo, de 150 μ L de resina para 1 mL, propiciou a melhor eficiência de purificação da aSFP recombinante obtida neste trabalho (Figura 41).

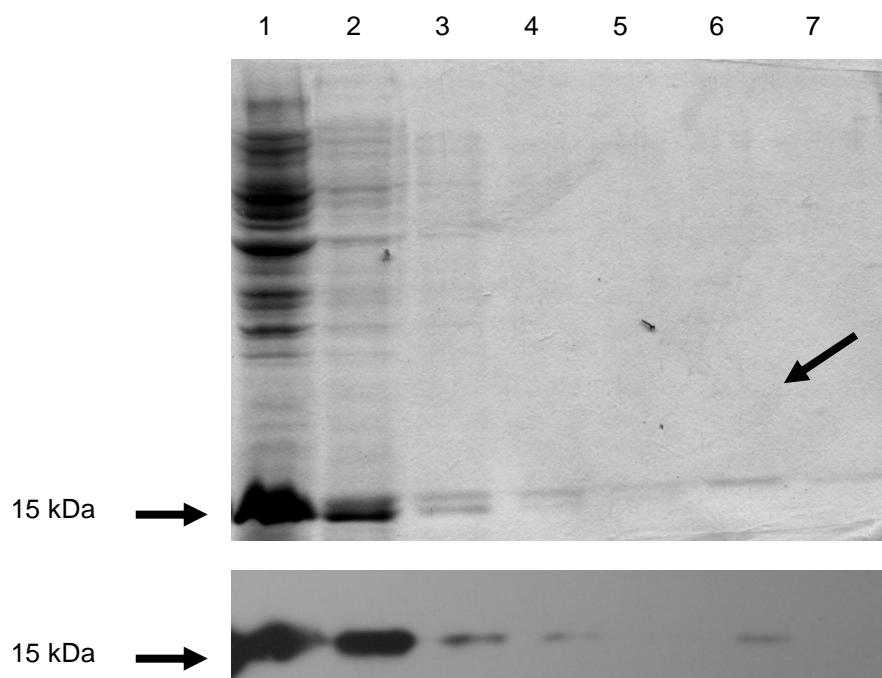


FIGURA 38 – Purificação da fração solúvel de aSFP_r-6xHis em condições nativas utilizando 150 μ L de resina. Setas indicam a banda de 15 kDa relativa a raSFP-6xHis. 1 – *Flow through*; 2 – 5 - lavagem da coluna com gradiente de imidazole (0 a 20 mM); 6 e 7 - Eluição com 250 mM de Imidazole. SDS-PAGE 14% e *Western blotting* com anticorpo anti-histag.

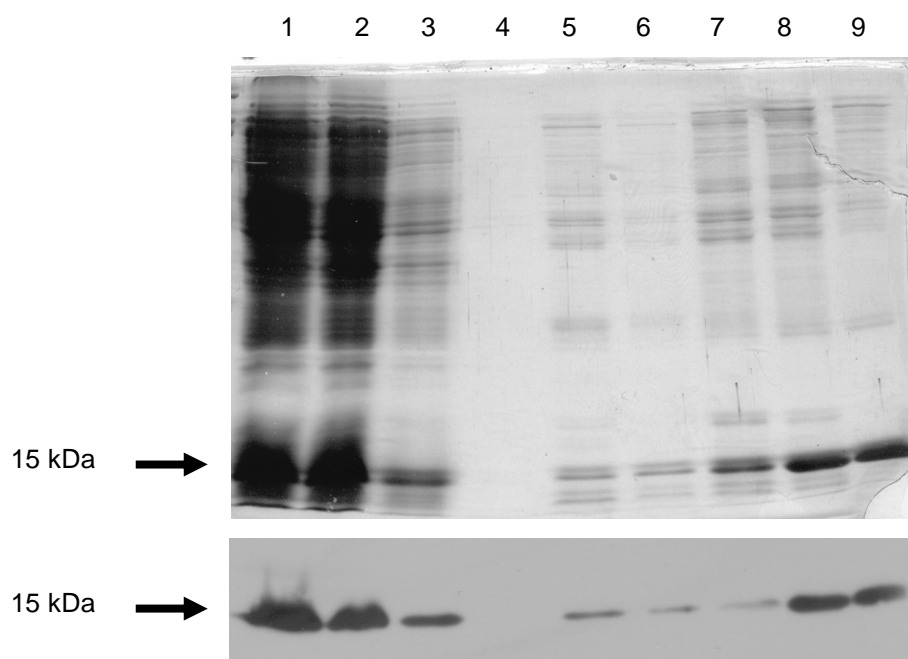


FIGURA 39 – Purificação da fração insolúvel de aSFPr-6xHis em condições híbridas utilizando 150 μ L de resina. Setas indicam a banda de 15 kDa relativa a raSFPr-6xHis. 1 – *Flow through*; 2 a 4 - lavagem da coluna com uréia 8M; 5 e 6 - lavagem da coluna sem uréia, com imidazole a 20 mM, 7 – 9 - Eluição com 250 mM de Imidazole. SDS-PAGE 14% e *Western blotting* com anticorpo anti-histag.

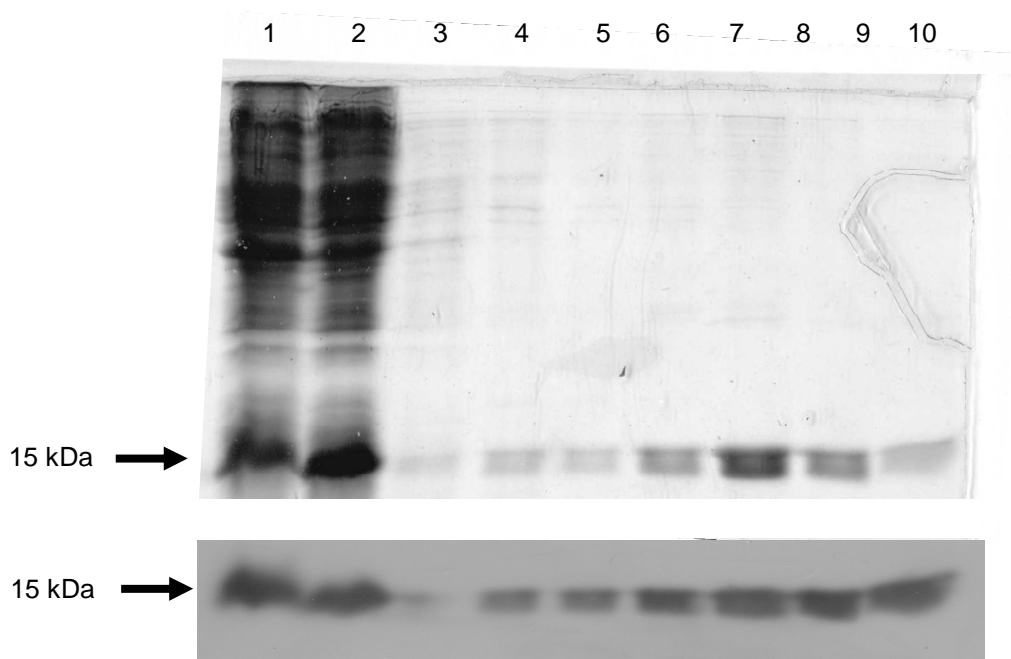


FIGURA 40 – Purificação da fração insolúvel de em condições desnaturantes utilizando 150 μ L de resina. Setas indicam a banda de 15 kDa relativa a α SFP r -6xHis. 1 – Flow through; 2 e 3 - lavagem da coluna com tampão pH 8; 4 e 5 - lavagem da coluna com tampão pH 6,3, 6 – 10 - Eluição com tampão com pH 4,5. SDS-PAGE 14% e *Western blotting* com anticorpo anti-histag.

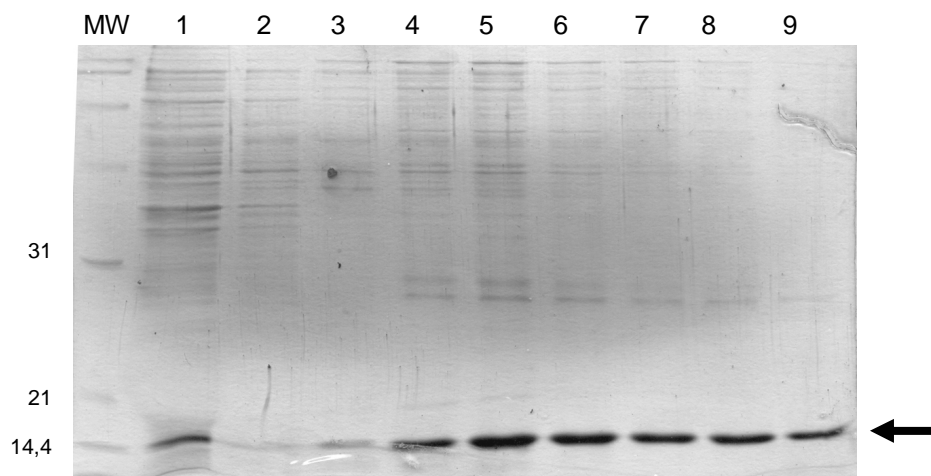


FIGURA 41 – Otimização da purificação da fração insolúvel de em condições desnaturantes, utilizando 1 mL de resina de níquel. A seta indica a aSFP_r-6xHis. 1 – *Flow through*; 2 – pool das etapas de lavagens da coluna; 3 a 9 - Eluição com tampão com pH 4,5. Eletroforese em gel SDS-PAGE 14%.

As frações de eluição foram colocadas em um único tubo tipo Centricon (Millipore) com tamanho de poro de 3,0 kDa, sendo centrifugado até concentrar o conteúdo 3 a 4 vezes (Figura 42). Com este procedimento, concentrou-se a proteína e promoveu a retirada da uréia do tampão de eluição, passo importante para que a proteína possa remodelar-se e apresentar atividade. A partir de 10 mL de cultura bacteriana foi possível purificar 2,5 mg/mL de aSFP_r-6xHis.

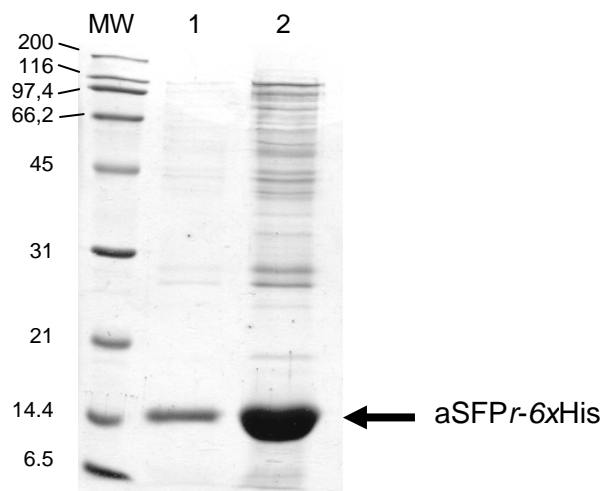


FIGURA 42 – Perfil eletroforético do pool das frações de eluição concentrado. Linha MW – Padrão de peso molecular em kDa; 1 – Pool antes da concentração; 2 – Pool após a concentração. Eletroforese em gel SDS-PAGE 14%.

4.6.2 Purificação da OPNr-6xHis por cromatografia por afinidade

A purificação da OPNr-6xHis mostrou-se mais difícil devido à baixa eficiência de expressão. Para contornar o problema, optou-se por trabalhar com volumes maiores de cultura, como 50 e 100 mL. A purificação da fração solúvel foi dificultada pela baixa afinidade da proteína à resina (Figura 43A, linha 6). A análise por imunoidentificação confirmou a perda de importante parte da proteína no *flow through* e primeira lavagem (Figura 43B, linhas 1 e 2). Esta baixa afinidade pelo níquel da coluna pode ser devido às características da OPNr-6x, excesso de ligações inespecíficas ou a uma sobrecarga protéica no sistema de purificação.

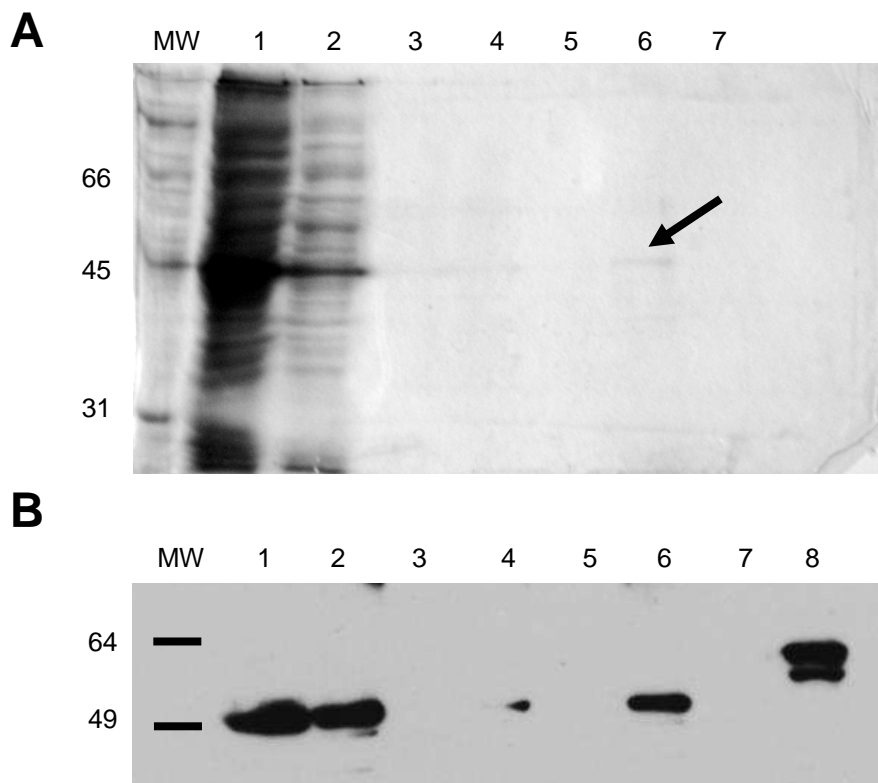


FIGURA 43 – Purificação da fração solúvel de *OPN-6xHis* em condições nativas utilizando 150 μ L de resina. A: Perfil protéico das frações de purificação. Linhas: 1 – *Flow through*; 2 a 5 - lavagem da coluna com tampão de lavagem com 20 mM de Imidazole, 6 – 7 - Eluição com tampão com 250 mM de Imidazole;. B: Imunoidentificação da proteína alvo nas diferentes etapas de purificação. Linhas: 1 a 7 – idêntico à Figura 23A, 8 - Controle positivo para o anticorpo anti-histag. MW – Padrão de peso molecular em kDa. SDS-PAGE 12% e *Western blotting* com anticorpo anti-histag.

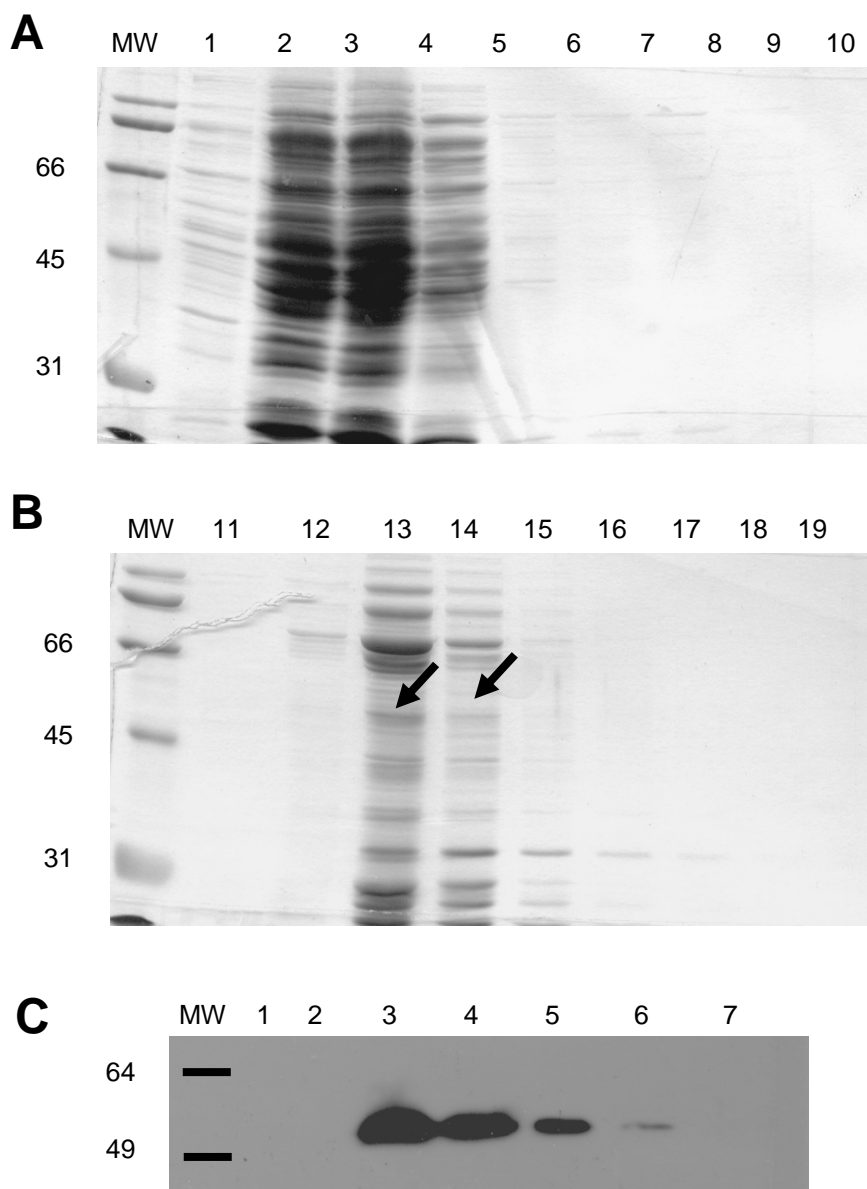


FIGURA 44 - Purificação da fração solúvel de OPNr-6xHis em condições nativas. A: Seqüência das lavagens da coluna: 1 e 2 – *Flow through*; 3 a 10 – lavagem com tampão com 20 mM de Imidazole. B: Eluição da proteína: 11 a 19 – frações de eluição com 250 mM de Imidazole. C: Imunodeteccção da proteína recombinante OPNr-6xHis usando anticorpo anti-histag: 1 e 2 – *Flow through*; 3 a 7 – correspondente as linhas 13 a 17 na Figura 25B. MW – Padrão de peso molecular em kDa. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

Com o aumento do leito da coluna (1 mL de resina de níquel), buscou-se diminuir a perda de proteína nas primeiras etapas de lavagem. Foi aumentado, também, o volume de lavagem em cada etapa (5 mL). Como resultado, obtivemos que a proteína alvo não foi perdida no *flow through* e nas primeiras lavagens (Figura 44C). Entretanto, apesar da intensa lavagem da coluna, a eluição da OPNr-6xHis foi obtida com grande contaminação de proteínas de origem bacteriana (Figura 44B, linhas 13 e 14).

Para tentar contornar este problema, foi adicionado 5 mM de imidazole no tampão de ligação da proteína à resina, objetivando-se diminuir a ligação inespecífica de outras proteínas. Os efeitos desta alteração no protocolo podem ser observados na Figura 45. Na linha 1 (*flow through*) pode ser observada uma perda da proteína, o que não foi observado na Figura 44C. Da mesma forma, essa perda ocorreu durante as lavagens (Figura 45 linhas 2, 4 e 5). A eluição novamente apresentou grande contaminação com outras proteínas, o que pode indicar que as ligações inespecíficas da resina podem estar interferindo na ligação da OPNr-6xHis.

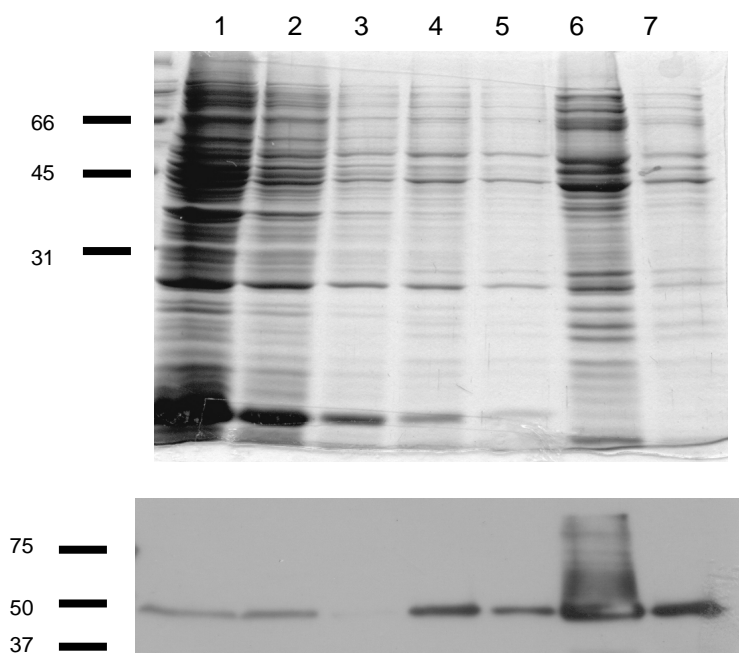


FIGURA 45 – Purificação da fração solúvel de *OPN-6xHis* em condições nativas com 1 mL de resina. Linhas: 1 – *Flow through*; 2 a 5 - lavagem da coluna com tampão de lavagem com 5 mM de Imidazole, 6 – 7 - Eluição com tampão com 250 mM de Imidazole; SDS-PAGE 12% e *Western blotting* com anticorpo anti-histag.

5. DISCUSSÃO

A criopreservação do sêmen bovino teve grande influência na produção animal, sendo decisiva no desenvolvimento da inseminação artificial, transferência de embriões e programas de melhoramento genético (Holt, 2000). As pesquisas em criobiologia de células espermáticas por anos basearam-se em metodologias nas quais foram testadas exaustivamente diferentes formas de envase do sêmen, diferentes curvas de refrigeração e congelamento e diferentes diluentes e crioprotectores (Klug et al., 1992; Holt, 2000; Medeiros et al., 2002). Entretanto, diversos autores afirmam que, apesar de décadas de estudos, pouco se evoluiu neste campo, uma vez que as perdas com a criopreservação do sêmen mamífero ainda são de aproximadamente 50% e que a predição da fertilidade em machos ainda é uma tarefa difícil (Amann & Pickett, 1987; Amann, 1989; Amann, 1995; Watson, 2000; Rodríguez-Martínez, 2003; Vishwanath, 2003; Alvarenga et al., 2005; Amann, 2005; Barbas & Mascarenhas, 2009).

Com os avanços da biotecnologia, novos parâmetros foram aos

poucos sendo adicionados às pesquisas em andrologia. Neste contexto, a proteômica do sêmen é uma das áreas que mais tem avançado, provendo respostas e, principalmente, gerando ainda mais questionamentos.

Esta tese propõe o desenvolvimento de novas ferramentas para o estudo do papel das proteínas do plasma seminal bovino na proteção espermática à crioinjúria. A produção de proteínas recombinantes é uma abordagem pouco utilizada na pesquisa de proteínas do plasma seminal, contudo é uma ferramenta promissora quando vencidas as complexas etapas de padronização (Lefebvre et al., 2009).

Nesse trabalho, optou-se pela produção recombinante das proteínas aSFP e OPN, ambas correlacionadas com a congelabilidade do sêmen bovino (Jobim, 2001). Suas atividades na função espermática já estão descritas (Schöneck et al., 1996; Moura, 2005), porém seu papel na proteção dos espermatozoides durante o processo da criopreservação ainda é desconhecido.

5.1 Uso de sistema eucarioto para expressão recombinante

Foi adotada a mesma estratégia de clonagem para ambas as proteínas alvo, baseada em *Escherichia coli*. O uso desta enterobactéria como biofábrica apresenta várias vantagens que a tornam a principal fonte de proteínas recombinantes (Baneyx, 1999). A *E. coli* já tem seu genoma conhecido e seu cultivo é facilmente mantido e economicamente viável para a produção em larga escala. Atualmente, estão disponíveis diversos sistemas de expressão, bem como linhagens geneticamente modificadas desta bactéria,

para atender as mais diversas condições de expressão recombinante (Baneyx, 1999; Schumann & Ferreira, 2004; Jana & Deb, 2005). Entretanto, fatores intrínsecos à fisiologia da bactéria dificultam alguns processos necessários para essa expressão, especialmente quando objetiva-se expressar proteínas de organismos eucariotos. A *E. coli* possui limitada capacidade para realizar modificações pós-traducionais, o que pode levar à ausência de atividade biológica da proteína (Wang et al., 2005). Isto ocorre devido à ausência de chaperonas específicas de eucariotos que promovem a conformação correta da proteína (Young et al., 2004). O sistema enzimático que envolve as chaperonas está presente em *E. coli*, entretanto este sistema evoluiu em eucariotos tornando-se mais amplo, com maior número de enzimas envolvidas no processo. Com isso, as alterações conformacionais dos peptídeos de eucariotos tornaram-se mais complexas, o que caracteriza uma importante barreira quando uma proteína de mamífero é sintetizada por uma bactéria (Young et al., 2004). A estrutura quaternária das proteínas aSFP e OPN possui interações entre domínios estruturais, envolvendo folhas beta pregueadas e alfa hélices (Sørensen et al., 1995; Romão et al., 1997). Estas características podem dificultar a obtenção de uma proteína recombinante bioativa quando sintetizada em sistema procarioto. Até o momento, não foi publicado nenhum resultado de atividade de aSFP recombinante, todavia Caltabiano et al. (1999) produziram OPN humana recombinante com atividade biológica.

Outras importantes modificações pós-traducionais, igualmente limitadas em *E. coli*, são glicosilação e fosforilação em resíduos específicos de

proteínas de eucariotos. A importância destas modificações variam para cada proteína, podendo estar ou não relacionadas a sua função biológica. A aSFP não é glicosilada (Romão et al., 1997), entretanto a OPN bovina apresenta 28 sítios de fosforilação e 3 sítios de O-glicosilação (Sørensen et al., 1995). Não se pode afirmar que esta característica teve influência na baixa eficiência da produção de OPN r -6xHis, contudo, sua atividade pode ser comprometida em função da ausência destas modificações pós-traducionais. A OPN humana recombinante obtida por Caltabiano et al. (1999) apresentou atividade, porém inconsistente. Clonada em vetor pQE9 e produzida em linhagem de *E. coli* M15, esta OPN recombinante promoveu a adesão celular em apenas uma das três linhagens de células testadas. Com base em seus resultados, os autores confirmaram a afinidade desta OPN aos receptores integrina $\alpha_v\beta_3$. Contudo afirmam que a ausência da ligação a $\alpha_v\beta_1$ e $\alpha_v\beta_5$ (já descrita por outros autores) pode estar relacionada à forma recombinante da proteína.

5.2 A opção pelo vetor pET23a(+)

Foi escolhido o vetor de expressão pET23a(+), um plasmídeo amplamente utilizado na expressão heteróloga de proteínas (Makrides, 1996; Baneyx, 1999; Berrow et al., 2006). Este vetor permite a produção da proteína fusionada com uma etiqueta de poli-histidina (His-tag), possibilitando a purificação de um só passo por cromatografia de afinidade. A região codificadora de ambas as proteínas foi clonada nos sítios *NdeI* e *XhoI* presentes na região do sítio múltiplo de clonagem (MCS) do plasmídeo. O uso destes sítios de restrição permitiu a clonagem “*in frame*” com a etiqueta de poli-

histidina, bem como diminuiu o número de aminoácidos extras entre a proteína propriamente dita e o His-*tag*, devido à localizações nas extremidades opostas do MCS.

No sistema pET, os genes alvo são posicionados à montante (“*upstream*”) do promotor do bacteriófago T7. Tipicamente, as bactérias usadas para expressão recombinante possuem um gene oriundo do profago (λ DE3) que codifica para uma T7 RNA polimerase de alta capacidade de processamento, controlada pelo promotor lacUV5 induzível por IPTG. Este sistema visa um maior controle de expressão, evitando a expressão basal do gene clonado. Contudo, em ambos os casos de expressões bem sucedidas de aSFP*r*-6xHis e OPN*r*-6xHis, houve vazamento na expressão (“*leaky expression*”), isto é, expressão sem adição de IPTG (0,5 e 1,0 mM, respectivamente). Foi proposto que o vazamento da expressão dos genes alvo é uma propriedade de sistemas controlados pelo operon *lac*, sendo relacionado como uma possível resposta à limitação nutricional da cultura (Grossman et al., 1998). O vazamento de expressão é um problema quando a proteína recombinante possui alguma toxicidade para a bactéria, conseqüentemente inviabilizando a cultura. Porém, no caso das proteínas estudadas, não foi observado nenhum efeito negativo à cultura.

5.3 Expressão insolúvel de aSFP*r*-6xHis e OPN*r*-6xHis

As expressões de aSFP*r*-6xHis e OPN*r*-6xHis foram obtidas em *Escherichia coli* BL21 pLysS, não sendo observada expressão nas outras linhagens testadas. A aSFP*r*-6xHis apresentou um padrão de superexpressão

distinguível em análise por SDS-PAGE, o que não foi observado na expressão de OPNr-6xHis. Esta última teve sua produção identificada apenas por *western blotting*. Em ambos os casos a expressão foi na forma insolúvel, acarretando a formação de corpos de inclusão. Estes resultados demonstram a dificuldade na produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, especialmente proteínas de eucariotos. Os diversos fatores que podem decidir se uma proteína será ou não expressa em determinada linhagem bacteriana ainda não estão claros (Makrides, 1996). Da mesma forma, a relação entre o vetor e o gene alvo também parece ter influência tanto na expressão quanto na solubilidade da proteína alvo. Nessa tese, dois diferentes genes foram clonados no mesmo vetor e transformados nas mesmas linhagens, porém, não se pôde definir a diferença no padrão de expressão entre aSFPr-6xHis e OPNr-6xHis.

A formação de corpos de inclusão é o grande obstáculo na expressão heteróloga de proteínas na forma solúvel e funcional (Ventura, 2005). Em *E. coli* recombinantes, a proteína alvo é o componente básico dos corpos de inclusão, contudo outras proteínas contribuem com a sua formação, ainda que em menor quantidade [revisado por Carrió & Villaverde, (2002)]. A agregação de proteínas recombinantes está envolvida com a presença limitada de chaperonas quando ocorrem altos níveis de expressão heteróloga. Nestas condições, uma quantidade exacerbada da proteína alvo é produzida, conduzindo à sua deposição. Este fato é facilitado pela associação intermolecular entre as superfícies hidrofóbicas expostas antes da conformação final da proteína estar completa (Corchero et al., 1996; Sørensen & Mortensen, 2005). Soma-se a isso o fato que estas proteínas não processadas são

resistentes à degradação proteolítica, o que acelera o processo de formação dos corpos de inclusão (Corchero et al., 1996).

Apesar de a bactéria ser geneticamente preparada para responder a condições naturais adversas do meio, ainda não foi identificado nenhum mecanismo natural que favoreça a correta modelagem da proteína recombinante durante sua superexpressão. Na tentativa de contornar este problema, diversos trabalhos propuseram a coexpressão com chaperonas (revisado por Nishihara et al., 2000). Essa classe de enzimas tem importância vital na modelagem protéica, sendo dividida em três sub-classes: (i) Modeladoras (*"Folding chaperones"*), promovem a dobra e desdobra de proteínas de forma ATP dependente, além de realizarem a proteólise de proteínas desnaturadas, conseqüentemente, evitando a agregação protéica (DnaK e GroEL); (ii) Estabilizadoras (*"Holding chaperones"*), estabilizam as proteínas parcialmente modeladas, diminuindo interações hidrofóbicas que podem levar a agregação (IbpA e IbpB); e (iii) Desagregadoras (*"Disaggregate chaperones"*), promovem a solubilização de agregados protéicos induzidos por estresse (ClpB e HtpG). A coexpressão recombinante com uma seleção de chaperonas (GroEL-GroES e DnaK-DnaJ-GrpE), possibilitou a síntese solúvel de algumas proteínas (Yoshimune et al., 2004; Xu et al., 2005). Todavia, tal estratégia não é garantia de solubilidade, uma vez que não foi bem sucedida para todas as proteínas estudadas (Nishihara et al., 2000; Hoffmann et al., 2004). Nesse trabalho, não optamos por esta metodologia, pois ela aumentaria o grau de complexidade do processo de produção de proteína recombinante. Contudo, caso a expressão solúvel não seja obtida por outros métodos, essa

poderá ser futuramente uma opção.

Outro fator envolvido na formação de corpos de inclusão é a seqüência da proteína alvo. Os primeiros estudos realizados na área já levantavam a hipótese de que as propriedades da cadeia polipeptídica tinham grande influência na formação dos agregados protéicos (Carrio & Villaverde, 2001). A descoberta dos chamados “*hot spots*” de agregação, regiões da seqüência da proteína que viabilizam a formação dos corpos de inclusão, permitiu entender o papel da seqüência na agregação protéica (Ventura et al., 2004). Em condições normais, estas regiões estão bloqueadas na forma globular da proteína, pois suas cadeias laterais estão escondidas em seu núcleo hidrofóbico ou já estão envolvidas em interações na mesma cadeia ou com outra subunidade. Desta forma, é promovida a estabilização conformacional da proteína (Ventura, 2005). Carrio et al. (2005) e Ami et al. (2003) demonstraram que as interações intermoleculares que promovem a formação dos corpos de inclusão envolvem interações tipo folha beta pregueada. Embora a exata natureza desta interação seja desconhecida, os resultados obtidos sugerem que as estruturas folha beta recém formadas contribuam para a formação de pontes de hidrogênio entre as proteínas recém expressas, induzindo a formação dos agregados protéicos (Ventura, 2005). Considerando que a OPN e especialmente a aSFP são proteínas que possuem diversas regiões de folha beta pregueada em suas estruturas, é razoável assumir que estas podem ter um papel determinante na expressão insolúvel observada neste trabalho. Conseqüentemente, nas condições trabalhadas a formação de núcleos de agregação pode ser facilitada no caso da aSFP_r-6xHis

e OPNr-6xHis.

A otimização da produção solúvel de proteínas recombinantes é um trabalho que demanda tempo, sendo baseada na tentativa e erro. Como não existem regras pré-definidas, tanto a expressão quanto a subsequente purificação têm seus protocolos adaptados para cada proteína. A fim de solucionar tais questões, alternativas têm sido propostas tais como a diminuição no nível de expressão recombinante, com o objetivo de inibir a formação de corpos de inclusão (Makrides, 1996; Hoffmann et al., 2004; Sørensen & Mortensen, 2005). Esta redução de síntese protéica pode ser realizada com a diminuição da temperatura de cultivo, que em alguns casos pode chegar a 4°C (Sørensen & Mortensen, 2005; Berrow et al., 2006). O aumento da solubilidade da proteína recombinante nestas condições de indução é atribuído a três fatores: (1) às interações hidrofóbicas que governam a formação dos corpos de inclusão, que são dependentes de alta temperatura; (2) a eliminação parcial das “heat shock proteins” (HSP) com atividade proteolítica, que estão ativas durante condições de superexpressão; e (3) às chaperonas da bactéria hospedeira (descritas anteriormente) que estão em maior concentração no citosol em temperaturas de cultivo de aproximadamente 30°C (Hoffmann et al., 2004; Sørensen & Mortensen, 2005; Berrow et al., 2006). As proteínas estudadas nesta tese não apresentaram alteração na solubilidade quando testadas diferentes condições de cultivo celular (isto é, temperaturas de indução e concentração de IPTG). No caso da proteína do plasma seminal humano BSPHI (Binding Sperm Protein Human I) recombinante, sua expressão solúvel foi possível apenas em cultivo a 16°C por

16 horas, o que demonstra a peculiaridade de cada proteína (Lefebvre, 2009).

Outra opção de alteração de protocolo é a clonagem do gene alvo em diferentes vetores de expressão. Esta não foi uma estratégia adotada neste trabalho, porém Lefebvre (2009) construiu três vetores distintos para a síntese de BSPHI baseados nos plasmídios pGEX-5x-I, pET15b e pET32a. Ao trabalhar com diversas construções, a autora pôde avaliar o efeito que cada vetor tinha sobre a solubilidade da proteína expressa. O melhor resultado obtido foi com a construção baseada em pET32a, que resultou na proteína alvo fusionada com tireodoxina (TrxA) e etiqueta de poli-histidina. A TrxA possui 11,7 kDa e é encontrada em leveduras, plantas e mamíferos, bem como em bactérias (Lavallie et al., 2002). Foi isolada pela primeira vez de *E. coli*, sendo caracterizada como um doador de hidrogênio para a ribonuclease redutase (Holmgren, 1985). Quando superexpressa em *E. coli*, a TrxA pode resultar em aproximadamente 40% da produção total da célula e na forma solúvel. O gene para a TrxA está presente em diversos plasmídios comerciais (Lavallie et al., 2002), sendo usado como uma etiqueta para aumentar a eficiência da tradução e solubilidade da proteína alvo, especialmente em células eucarióticas. Essa poderá também ser uma estratégia utilizada futuramente em nossos experimentos para aumentar a eficiência da produção e solubilização das proteínas recombinantes.

5.4 Purificação por cromatografia de afinidade

A questão de solubilidade da proteína recombinante foi um fator determinante na elaboração dos protocolos de purificação. O método de

purificação escolhido, cromatografia por afinidade por metal imobilizado (IMAC), não apresentou resultados positivos, quando realizado na forma nativa, uma vez que as proteínas recombinantes presentes na fração solúvel apresentaram pouca ou nenhuma afinidade pelo níquel da coluna. Uma possível explicação para este problema é a má conformação da proteína ou a formação dos núcleos de agregação. Conseqüentemente, a etiqueta de poli-histidina pode ter ficado sem contato com o leito da coluna durante o processo de ligação à resina. Esta hipótese é corroborada pelo aumento da afinidade ao níquel quando a aSFP r -6xHis foi purificada na forma desnaturante. A solubilização dos corpos de inclusão com 8 M de uréia possivelmente promoveu a exposição do His-tag, viabilizando sua ligação ao metal da coluna.

A incorporação de outros métodos no processo de purificação, como cromatografia por exclusão de tamanho ou outro ligante para cromatografia de afinidade e troca iônica, não foi realizada em virtude do objetivo de obtenção de um método prático e economicamente viável para a produção recombinante de aSFP e OPN. O uso da etiqueta de poli-histidina para purificação é vantajosa por ser um processo de um passo e resultar em eluições de alta pureza. Estas características são muito desejadas quando se almeja uma produção em maior escala para aplicação comercial da proteína produzida, o que é um dos nossos objetivos futuros.

A escolha pela etiqueta de poli-histidina foi baseada em um modelo de sucesso, amplamente utilizado (Terpe, 2003). A popularidade da utilização do His-tag é devido a sua alta afinidade a íons de metais de transição (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), e ao seu reduzido tamanho, variando de 2 a 10 resíduos. A

histidina é o aminoácido que possui a interação mais forte com os íons citados, devido à formação de ligações coordenadas entre os grupos doadores de elétrons presentes no anel imidazólico deste aminoácido e os íons de metais de transição imobilizados na matriz da coluna de purificação (Terpe, 2003).

O tamanho da etiqueta de histidina obtida com o uso do vetor pET é de 6 resíduos, resultando num peptídeo de aproximadamente 0,84 kDa (Terpe, 2003). Devido ao reduzido tamanho, esta etiqueta raramente interfere na conformação e na atividade biológica da proteína alvo, fato que não ocorre em outras etiquetas para purificação como Glutathione S-transferase (GST-tag, 26 kDa) e Proteína de Ligação a Maltose (MBP-tag, 40 kDa). Entre estas etiquetas de maior peso molecular e a proteína alvo são expressos sítios de clivagem, normalmente para as enzimas trombina e enterocinase, promovendo assim a separação do GST-tag ou MBP-tag da proteína recombinante de interesse (Hengen, 1996; Terpe, 2003).

Os resultados apresentados mostram que foi possível desenvolver duas ferramentas moleculares para obtenção de OPN e aSFP bovinas recombinantes. A metodologia para produção de OPN r -6xHis deve ser revista, visando uma maior eficiência de expressão, bem como sua obtenção na forma solúvel. Futuramente, serão realizadas alterações na estratégia de clonagem como criação de novos vetores baseados em outros plasmídios e a avaliação da expressão heteróloga em diferentes linhagens de *E. coli*. Com isso, buscar-se-á encontrar o melhor protocolo para expressão e purificação da OPN r -6xHis. Com a posterior confirmação da atividade biológica da aSFP r -6xHis, sua produção poderá ser otimizada a partir do presente método para a obtenção de

maiores quantidades da proteína para sua utilização em estudos bioquímicos e funcionais, visando uma possível aplicação comercial em diluentes para sêmen de touros de baixa congelabilidade. É importante destacar que ainda é tímida a utilização da tecnologia de produção de proteínas recombinantes para pesquisa e aplicação em andrologia. Porém, seu potencial como instrumento de pesquisa e ferramenta terapêutica para animais domésticos e humanos justificam seu aperfeiçoamento e expansão.

6. CONCLUSÕES

- A proteína aSFP pode ser produzida na forma recombinante utilizando o vetor pET23a(+) em *E. coli* BL21 pLysS.
- A aSFP r -6xHis pode ser purificada por cromatografia de afinidade com o protocolo desnaturante.
- A transformação de *E. coli* BL21 pLysS com o vetor pET-OPN resultou em baixa expressão de OPN r -6xHis, impossibilitando sua purificação.

7. PERSPECTIVAS

- Testar o efeito da adição da aSFP r -6xHis no sêmen bovino fresco e congelado para confirmar sua bioatividade.
- Confirmar a atividade biológica da aSFP r -6xHis, e realizar testes para avaliar os efeitos da sua adição no sêmen congelado de touros de baixa congelabilidade.
- Produzir anticorpos policlonais para a identificação por imunodeteção da aSFP no sêmen de touros, possibilitando a quantificação relativa desta proteína no plasma seminal de animais de alta e baixa congelabilidade.
- Clonar o cDNA da OPN no vetor de expressão pET32a, para fusionar esta proteína com etiqueta de tireodoxina e polihistidina e expressá-la em linhagem Origami (DE3) pLysS. Assim, objetiva-se aumentar a expressão solúvel desta proteína, viabilizando a purificação de OPN r -6xHis com atividade biológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International**, Londres, v.95, p.503–507, 2005.
- AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **Int. J. Androl.**, Hoboken, v.29, p.69-75, 2006.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reprod. Fertil. Develop.**, Clayton South, v.16, p.581-588, 2004.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.89, p.105-113, 2005.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit and mouse epididymal spermatozoa: dependence of rate on temperature and oxygen concentration. **Biol. Reprod.**, Madison, v.32, p.342-51, 1985.
- AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. **J. Androl.**, Hoboken, v.10, p.89–98, 1989.
- AMANN, R. P. Evaluation of sperm quality: Can we pick the winners? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, 1995. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. v.1, p. 206-212.
- AMANN, R. P. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, p.698-715, 2005.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **J. Eq. Vet. Sci.**, Amsterdam, v.7, p.145-174, 1987.

- AMI, D.; BONECCHI, L.; CALI, S.; ORSINI, G.; TONON, G.; DOGLIA, S. M. FT-IR study of heterologous protein expression in recombinant *Escherichia coli* strains. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1624, p.6-10, 2003.
- AMMAN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKCINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine Reproduction**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.715-745.
- ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Relatório Estatístico de Produção, Importação e Comercialização de Sêmen**. Uberaba, 2009.
- AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, Amsterdam, v.46, p.791-7, 1996.
- AX, R. L.; DICKSON, K.; LENZ, R. W. Induction of Acrosome Reactions by Chondroitin Sulfates in Vitro Corresponds to Nonreturn Rates of Dairy Bulls. **J. Dairy Sci.**, Stanford, v.68, 1985, p.387-390, 1985.
- BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. **Can. J. An. Sci.**, Ottawa, v.74, p.45-51, 1994.
- BALBAS, P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. **Mol. Biotechnol.**, New York, v.19, p.251-67, 2001.
- BANERJEE, A. K.; GANGULI, N. C. Differentiation of semen from *Bos bubalus* and *Bos taurus indicus* by starch gel electrophoresis. **J. Anim. Sci.**, Stanford, v.32, 1971.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Amsterdam, v.10, p.411-21, 1999.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nat. Biotechnol.**, Boston, v.22, p.1399-408, 2004.
- BARBAS, J.; MASCARENHAS, R. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tis. Bank.**, Dordrecht, v.10, p.49-62, 2009.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **J. Androl.**, Hoboken, v.24, p.621-628, 2003.
- BENNET, J. P. Quantitative comparisons of the proteins of the seminal plasmas of bull, ram, rabbit and boar by agar gel electrophoresis. **J. Reprod. Fertil.**, Stanford, v.12, p. 23-31, 1965.

- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Mol. Reprod. Dev.**, Amsterdam, v.71, p.461-70, 2005.
- BERROW, N. S.; BUSSOW, K.; COUTARD, B.; DIPROSE, J.; EKBERG, M.; FOLKERS, G. E.; LEVY, N.; LIEU, V.; OWENS, R. J.; PELEG, Y.; PINAGLIA, C.; QUEVILLON-CHERUEL, S.; SALIM, L.; SCHEICH, C.; VINCENTELLI, R.; BUSSO, D. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. **Acta Crystallogr.**, Nova York, v.62, p.1218-26, 2006.
- BLANC, G.; FONT, B.; EICHENBERGER, D.; MOREAU, C.; RICARD-BLUM, S.; HULMES, D. J. S.; MOALI, C. Insights into How CUB Domains Can Exert Specific Functions while Sharing a Common Fold. **J. Biol. Chem.**, São Francisco, v.282, 2007, p.16924-16933, 2007.
- BORK, P.; BECKMANN, G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. **J. Mol. Biol.**, Nova York, v.231, p.539-45, 1993.
- BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, Amsterdam, v.52, p.863-73, 1999.
- BRASIL. **Agricultura brasileira em números. Anuário 2003**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 out. 2009.
- BUTLER, W. T. Structural and functional domains of osteopontin. **An. New York Acad. Sci.**, New York, v.760, p.6-11, 1995.
- CALTABIANO, S.; HUM, W.-T.; ATTWELL, G. J.; GRALNICK, D. N.; BUDMAN, L. J.; CANNISTRACI, A.; BEX, F. J. The Integrin Specificity of Human Recombinant Osteopontin. **Biochem. Pharmacol.**, Nova York, v.58, p.1567-1578, 1999.
- CALVETE, J. J.; ENSSLIN, M.; MBURU, J.; IBORRA, A.; MARTINEZ, P.; ADERMANN, K.; WABERSKI, D.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E.; WEITZE, K. F.; EINARSSON, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. **Biol. Reprod.**, Nova York, v.57, p.735-42, 1997.
- CALVETE, J. J.; SANZ, L. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.**, Londres, v.65, p.201-215, 2007.

- CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin Is the 55-Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biol. Reprod.**, Nova York, v.57, p.1293-1301, 1997.
- CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin Localization in the Holstein Bull Reproductive Tract. **Biol. Reprod.**, Nova York, v.60, p.454-460, 1999.
- CARRIO, M.; GONZALEZ-MONTALBAN, N.; VERA, A.; VILLAVERDE, A.; VENTURA, S. Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. **J. Mol. Biol.**, Nova York, v.347, p.1025-37, 2005.
- CARRIO, M. M.; VILLAVERDE, A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. **FEBS Lett.**, Londres, v.489, p.29-33, 2001.
- CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **J. Biotechnol.**, Boston, v.96, p.3-12, 2002.
- CHATEERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev.**, Amsterdam, v.59, p.451-458, 2001.
- CORCHERO, J. L.; VIAPLANA, E.; BENITO, A.; VILLAVERDE, A. The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in *E. coli*. **J. Biotechnol.**, Boston, v.48, p.191-200, 1996.
- DE LARAMINDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.10, p.15-21, 1995.
- DESNOYERS, L.; THERIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Mol. Reprod. Dev.**, Amsterdam, v.37, p.425-35, 1994.
- 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. **Biol. Chem. Hoppe. Seyler**, Berlin, v.375, p.457-61, 1994.
- EDDY, E. M. The Spermatozoon. In: D. N. JIMMY; M. P. TONY; W. P. DONALD; R. G. C. JOHN; M. D. K. DAVID; S. R. JOANNE E M. W. PAUL (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3.ed. St Louis: Academic Press, 2006. p.3-54.
- EINSPANIER, R.; AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F.; HENLE, T.; ROPKE, R.; SCHAMS, D. Localization and concentration of a new bioactive acetic

- seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos taurus*). **J. Reprod. Fertil.**, Stanford, v.98, p.241-244, 1993.
- EINSPANIER, R.; EINSPANIER, A.; WEMPE, F.; SCHEIT, K. H. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. **Biochem. Bioph. Res. Comm.**, Amsterdam, v.179, p.1006-1010, 1991.
- ELORZA, U. U.; CORCHERO, J.; FRUITOS, E. G.; RUBIO, V. T.; MENDOZA, R.; CORRALES, A. V.; MIRALLES, N. F. Recombinant production of a difficult-to-express eukaryotic protein in a bacterial expression system. **New Biotech.**, Nova York, v.25, p.S121-S121, 2009.
- FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochem. J.**, Boston, v.232, p.715-24, 1985.
- FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. SDS-PAGE characterization of the proteins in equine seminal plasma. **Theriogenology**, Amsterdam, v.46, Sep, p.579-91, 1996.
- FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M.; BROOKS, C. L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-milliliter straws. **Theriogenology**, Amsterdam, v.46, p.1103-15, 1996.
- GABLER, C.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. **Reproduction**, Cambrigde, v.126, p.721-729, 2003.
- GARDE, S.; FRASER, J. E.; NEMATPOOR, N.; POLLEX, R.; MORIN, C.; FORTE, A.; RABBANI, S.; PANCHAL, C.; GUPTA, M. B. Cloning, expression, purification and functional characterization of recombinant human PSP94. **Prot. Exp. Purific.**, New York, v.54, p.193-203, 2007.
- GENOMED. **JETQUICK Spin Column Technique**. Löhne: Genomed, 2005.
- GEORGIEV, G. H. Isoelectric focusing of bull seminal plasma proteins. **Inter. J. Biochem.**, Amsterdam, v.9, p.327-330, 1978.
- GONÇALVES, R. F.; CHAPMAN, D. A.; BERTOLLA, R. P.; EDER, I.; KILLIAN, G. J. Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in vitro fertilization and embryo development. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.108, p.375-83, 2008.
- GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alfa V and alfa 5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, Amsterdam, v.67, p.468-474, 2007.

- GROSSMAN, T. H.; KAWASAKI, E. S.; PUNREDDY, S. R.; OSBURNE, M. S. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. **Gene**, Nova York, v.209, p.95-103, 1998.
- GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; SUAREZ, S. S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biol. Reprod.**, Amsterdam, v.69, p.809-15, 2003.
- HAASE, B.; SCHLÖTTERER, C.; HUNDRIESER, M. E.; KUIPER, H.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Evolution of the spermadhesin gene family. **Gene**, Nova York, v.352, p.20-29, 2005.
- HENGEN, P. N. Purification of GST fusion proteins. **TIBS**, Londres, v.21, p.400-401, 1996.
- HOCHGREBE, T. T.; HUMPHREYS, D.; WILSON, M. R.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. A reexamination of the role of clusterin as a complement regulator. **Exp. Cell Res.**, Philadelphia, v.249, p.13-21, 1999.
- HOFFMANN, F.; HEUVEL, J. V. D.; ZIDEK, N.; RINAS, U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. **Enz. Microb. Technol.**, Amsterdam, v.34, p.235-241, 2004.
- HOLMGREN, A. Glutaredoxin from *Escherichia coli* and calf thymus. **Meth. Enzymol.**, Nova York, v.113, p.525-40, 1985.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.62, p.3-22, 2000.
- HOWES, E. A.; HURST, S.; LASLOP, A.; JONES, R. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. **Mol. Hum. Reprod.**, Nova York, v.4, p.673-81, 1998.
- HUMPHREYS, D. T.; CARVER, J. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B.; WILSON, M. R. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **J. Biol. Chem.**, São Francisco, v.274, p.6875-81, 1999.
- IBRAHIM, N. M.; GILBERT, G. R.; LOSETH, K. J.; CRABO, B. G. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. **J. Androl.**, Hoboken, v.21, p.887-94, 2000.
- IBRAHIM, N. M.; ROMANO, J. E.; TROEDSSON, M. H.; CRABO, B. G. Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. **J. Androl.**, Hoboken, v.22, p.863-77, 2001.

- INVITROGEN. **One Shot[®] TOP10 Competent Cells**. 2. ed. Carlsbad, 2004
- INVITROGEN. **Ni-NTA Purification System: For purification of polyhistidine-containing recombinant proteins**. 3. ed. Carlsbad, 2006a.
- INVITROGEN. **TOPO TA Cloning[®]: Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products**. 2. ed. Carlsbad, 2006b.
- JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Nova York, v.67, p.289-98, 2005.
- JOBIM, M. I. M. **Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua correlação com a congelabilidade do semem bovino**. 2001. 146 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
- JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, Amsterdam, v.61, p.255-266, 2004.
- JONES, R.; JAMES, P. S.; HOWES, L.; BRUCKBAUER, A.; KLENERMAN, D. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. **As. J. Androl.**, Tokio, v.9, p.438-444, 2007.
- JUNGBAUER, A.; KAAR, W.; SCHLEGL, R. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Londres, v.15, p.487-494, 2004.
- KEMME, M.; MADIRAJU, M. V.; KRAUHS, E.; ZIMMER, M.; SCHEIT, K. H. The major protein of bull seminal plasma is a secretory product of seminal vesicle. **Biochim. Biophys. Acta**, Helsinke, v.884, Nov 19, p.282-90, 1986.
- KEMME, M.; THEIL, R.; MADIRAJU, M. V.; SCHEIT, S.; SCHEIT, K. H. Characterization of basic proteins of bull seminal plasma. **Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.**, Berlin, v.365, p.1173-1181, 1984.
- KERR, J. M.; FISHER, L. W.; TERMINE, J. D.; YOUNG, M. F. The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin. **Gene**, Nova York, v.108, p.237-243, 1991.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, Nova York, v.49, p.1202-1207, 1993.
- KIM, J. S.; RAINES, R. T. Bovine seminal ribonuclease produced from a synthetic gene. **J. Biol. Chem.**, São Francisco, v.268, p.17392-6, 1993.

- KIRK, E. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.68, p.317-318, 2001.
- KIRTON, K. T.; HAFS, H. D.; HUNTER, A. G. LEVELS OF SOME NORMAL CONSTITUENTS OF BULL SEMEN DURING REPETITIVE EJACULATION. **J. Reprod. Fertil.**, Stanford, v.8, p.157-164, 1964.
- KLUG, E.; ROBBELEN, I.; KNEISSL, S.; SIEME, H. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Acta Vet. Scand. Suppl.**, Helsinke, v.88, p.129-135, 1992.
- KUISMA, P.; ANDERSSON, M.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Vet. Scand.**, Helsinke, v.48, p.14, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Boston, v.227, p.680-5, 1970.
- LARSON, B. L.; GRAY, R. S.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma. II. Ultracentrifugal and immunological studies and comparison with blood and milk serum. **J. Biol. Chem.**, São Francisco, v.211, p.43-52, 1954.
- LARSON, B. L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma. I. Preliminary and electrophoretic studies. **J. Biol. Chem.**, São Francisco, v.206, p.741-749, 1954.
- LAVALLE, E. R.; DIBLASIO-SMITH, E. A.; COLLINS-RACIE, L. A.; LU, Z.; MCCOY, J. M. Thioredoxin and Related Proteins as Multifunctional Fusion Tags for Soluble Expression in *E. coli*. In: VAILLANCOURT, P. E. **E. coli Gene Expression Protocols**. New York: Humana Press, 2002. p.119-140.
- LEFEBVRE, J. **Les gènes et protéines BSP chez la souris et l'humain : clonage, caractérisation, expression sous forme recombinante et étude des fonctions biologiques**. 2009. 222 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Département de Biochimie, Faculté de Médecine Université de Montréal, Montréal, 2009.
- LEFEBVRE, J.; BOILEAU, G.; MANJUNATH, P. Recombinant expression and affinity purification of a novel epididymal human sperm-binding protein, BSPH1. **Mol. Hum. Reprod.**, Nova York, v.15, p.105-114, 2009.
- LESSARD, C.; PARENT, S.; LECLERC, P.; BAILEY, J. L.; SULLIVAN, R. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. **J. Androl.**, Hoboken, v.21, p.700-7, 2000.

- LESSARD, C.; PARENT, S.; LECLERC, P.; SULLIVAN, R. The protein P25b: A possible explanation of the lost of fertility of thawed bull sperm. **Theriogenology**, Amsterdam, v.51, p.347-347, 1999.
- LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.-G.; F.CASPER, R. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, Cambridge, v.13, p.896–900, 1998.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, São Francisco, v.193, p.265-275, 1951.
- MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, Nova York, v.60, Sep, p.512-38, 1996.
- MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.**, Londres, v.65, p.217-228, 2007.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochem. J.**, Boston, v.241, p.685-692, 1987.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Biosci. Rep.**, Nova York, v.7, p.231-238, 1987.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation **J. Reprod. Immunol.**, Boston, v.53, p.109-119 2002.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male Reproductive Function and Semen**. Berlin: Springer-Verlag, 1981.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, Amsterdam, v.57, p.327-344, 2002.
- MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I.; HAVT, A.; DA CUNHA, R. M.; MARTINS, D. B.; CASTELLETTI, C. H.; DE SOUZA, P. R.; FILHO, J. L.; FREITAS, V. J.; CAVADA, B. S.; RADIS-BAPTISTA, G. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. **Mol. Reprod. Dev.**, Amsterdam, v.75, p.8-16, 2008.
- MESEGUER, M.; GARRIDO, N.; MARTÍNEZ-CONEJERO, J. A.; SIMÓN, C.; PELLICER, A.; REMOHÍ, J. Relationship Between Standard Semen Parameters, Calcium, Cholesterol Contents, and Mitochondrial Activity in

- Ejaculated Spermatozoa From Fertile and Infertile Males. **J. Assist. Reprod. Genet.**, Londres, v.21, p.445-451, 2004.
- MILLER, D. J.; AX, R. L. An Improved Assay for Measuring Heparin Binding to Bull Sperm. **J. Dairy Sci.**, Stanfond, v.71, p.239-244, 1988.
- MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biol. Reprod.**, Nova York, v.42, p.899-915, 1990.
- MONACO, E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; ZICARELLI, L.; KILLIAN, G. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 71, p. 450-457, 2009.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, Nova York, v.51, p.241-249, 2005.
- MORTARINO, M.; TEDESCHI, G.; NEGRI, A.; CECILIANI, F.; GOTTARDI, L.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, Cambridge, v.19, p.797-801, 1998.
- MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Anim. Reprod.**, Belo Horizonte, v.2, p.3-10, 2005.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **J. Androl.**, Hoboken, v.27, p.534-541 2006a.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.98, p.169-188, 2007.
- MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. **J. Androl.**, Hoboken, v.27, p.201-211, 2006b.
- NASS, S. J.; MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Mol. Reprod. Dev.**, Amsterdam, v.25, p.237-46, 1990.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their

- quantification in seminal plasma and sperm. **Biol. Reprod.**, Nova York, v.63, p.1058-66, 2000.
- NISHIHARA, K.; KANEMORI, M.; YANAGI, H.; YURA, T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Nova York, v.66, p.884-9, 2000.
- NOVAGEN. **pET System Manual**. 3. ed. Darmstadt, 2006.
- O'FARRELL, P. H.; O'FARRELL, P. Z. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic fractionation. **Methods Cell Biol.**, Londres, v.16, p.407-20, 1977.
- PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics--success rates, market trends and values to 2010. **Nat. Biotechnol.**, Boston, v.22, Dec, p.1513-9, 2004.
- PINNA, L. A.; DONELLA-DEANA, A.; MEGGIO, F. Structural features determining the site specificity of rat liver cAMP-independent protein kinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Amsterdam, v.87, p.114-120, 1979.
- POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C. **Nature**, Boston, v.169, p.626, 1952.
- QIAGEN. **QIAprep® Miniprep Handbook**: For purification of molecular biology grade DNA. Düsseldorf, 2006.
- REINERT, M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. **Andrologia**, Cambridge, v.29, p.179-86, 1997.
- REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. A. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biol. Reprod.**, New York, v.66, p.159-66, 2002.
- RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N.; BREITBART, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, Nova York, v. 70, p. 518-522, 2004.
- ROBERTSON, L.; WATSON, P. F. Calcium transport in diluted or cooled ram sperm. **J. Reprod. and Fertil.**, Cambridge, v.77, p.177-185, 1986.
- ROCHA, M. C.; GARCIA, O. S.; FERREIRA NETO, J. M.; SCHONS, J. A. B. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de

- touras zebus com alterações reprodutivas. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, v.26, p.223-233, 1974.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia? **Reprod. Dom. Anim.**, Amsterdam, v.38, p.312-318, 2003.
- RODRÍGUEZ, C. M.; DAY, J. R.; KILLIAN, G. J. Osteopontin Gene Expression in the Holstein Bull Reproductive Tract. **J. Androl.**, Hoboken, v.21, p.414-420, 2000.
- ROMÃO, M. J.; KÖLLN, I.; DIAS, J. M.; CARVALHO, A. L.; ROMERO, A.; VARELA, P. F.; SANZ, L.; TÖPFER-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. **J. Mol. Biol.**, Nova York, 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. **Nat. Struct. Biol.**, Boston, v.4, p.783-8, 1997.
- RONCOLETTA, M. **Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal bovino relacionados com a congelabilidade do sêmen de touros**. 2000. 109 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. **ARS Vet.** Jaboticabal, v.13, p.135-140, 1997.
- RONCOLETTA, M.; MORANI, E. D. S. C.; ESPER, C. R.; BARNABE, V. H.; FRANCESCHINI, P. H. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.91, p.77-87, 2006.
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol. Cell. Biochem.**, New York, v.307, p.249-64, 2008.
- SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; MANICARDI, G.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P. G.; BIANCHI, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Rev. Reprod.**, Boston, v.4, p.31-37, 1999.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual** 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

- SCHEIT, K. H.; KEMME, M.; AUMULLER, G.; SEITZ, J.; HAGENDORFF, G.; ZIMMER, M. The major protein of bull seminal plasma: biosynthesis and biological function. **Biosci. Rep.**, Nova York, v.8, p.589-608, 1988.
- SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal plasma protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, Amsterdam, v.45, p.633-642, 1996.
- SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Gen. Mol. Biol.**, São Paulo, v.27, p.442-453, 2004.
- SEIDAH, N. G.; MANJUNATH, P.; ROCHEMONT, J.; SAIRAM, M. R.; CHRÉTIEN, M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. **Biochem. J.**, São Francisco, v.243, p.195-203, 1987.
- SERGERIE, M.; BLEAU, G.; TEULÉ, R.; DAUDIN, M.; BUJAN, L. Intégrité de l'ADN des spermatozoïdes comme élément diagnostique et pronostique de la fertilité masculine. **Gyn. Obst. Fertil.**, Paris, v.33, p.89-101, 2005.
- SIU, M. K.; MRUK, D. D.; LEE, W. M.; CHENG, C. Y. Adhering junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of beta 1-integrin and focal adhesion complex-associated proteins. **Endocrinology**, New York, v.144, May, p.2141-63, 2003.
- SØRENSEN, E. S.; HOJRUP, P.; PETERSEN, T. E. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: Identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. **Prot. Sci.**, New York, v.4, p.2040-2049, 1995.
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, Londres, v.115, p.113-128, 2005.
- SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; MONACO, E.; KILLIAN, G. J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.105, p.72-89, 2008.
- SULLIVAN, R.; ROBITAILLE, G. Heterogeneity of epididymal spermatozoa of the hamster. **Gam. Res.**, Londres, v.24, p.229-36, 1989.
- SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. IN: CHRISTOPHER, D. J.; BARRATT, J. E. C. L. R. **The Sperm Cell**. New York: Cambridge University Press, 2006. p.1-30.

- TANNERT, A.; TÖPFER-PETERSEN, E.; HERRMANN, A.; MÜLLER, K.; MÜLLER, P. The Lipid Composition Modulates the Influence of the Bovine Seminal Plasma Protein PDC-109 on Membrane Stability. **Biochemistry**, Nova York, v.46, p.11621-11629, 2007.
- TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **Euro. J. Biochem.**, Amsterdam, v.267, p.6175-9, 2000.
- TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Nova York, v.60, p.523-33, 2003.
- THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. **Biol. Reprod.**, Cambridge, v.59, p.768-776, 1998.
- THOMAS, J. G.; AYLING, A.; BANEYX, F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Nova York, v.66, p.197-238, 1997.
- TWIGG, J.; IRVINE, D. S.; HOUSTON, P. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. **Mol. Hum. Reprod.**, Cambridge, v.4, p.439-445, 1998.
- VARELA, P. F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMAO, M. J.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **J. Mol. Biol.**, Londres, v.274, p.635-49, 1997.
- VENTURA, S. Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. **Microb. Cell Factor.**, Nova York, v.4, p.11, 2005.
- VENTURA, S.; ZURDO, J.; NARAYANAN, S.; PARRENO, M.; MANGUES, R.; REIF, B.; CHITI, F.; GIANNONI, E.; DOBSON, C. M.; AVILES, F. X.; SERRANO, L. Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Nova York, v.101, p.7258-63, 2004.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, Amsterdam, v.59, p.571-584, 2003.
- WANG, F.; LIU, Y.; CHEN, J.; SU, Z. Chromatographic refolding of proteins: molecular action and column control. **China Particuol.**, Pequín, v.3, p.337-342, 2005.

- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, Londres, v.7, p.871-91, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.60-61, p.481-492, 2000.
- WATSON, P. F.; DUNCAN, A. E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, Nova York, v.25, p.131-142, 1988.
- WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M.; JONES, P. S.; BREDL, J. C. Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, Amsterdam, v.41, p.513-20, 1995.
- WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: Acidic seminal fluid protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Nova York, v.183, p.232-237, 1992.
- WOLFE, D. F.; BRADLEY, J. T.; RIDDELL, M. G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, Amsterdam, v.40, p.1083-1091, 1993.
- WU, C. H.; BALASUBRAMANIAN, W. R.; KO, Y. P.; HSU, G.; CHANG, S. E.; PRIJOVICH, Z. M.; CHEN, K. C.; ROFFLER, S. R. A simple method for the production of recombinant proteins from mammalian cells. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, Boston, v.40, p.167-172, 2004.
- XU, H. M.; ZHANG, G. Y.; JI, X. D.; CAO, L.; SHU, L.; HUA, Z. C. Expression of soluble, biologically active recombinant human endostatin in *Escherichia coli*. **Prot. Expr. Purif.**, Amsterdam, v.41, p.252-8, 2005.
- YOSHIMUNE, K.; NINOMIYA, Y.; WAKAYAMA, M.; MORIGUCHI, M. Molecular chaperones facilitate the soluble expression of N-acyl-D-amino acid amidohydrolases in *Escherichia coli*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.31, p.421-6, 2004.
- YOUNG, J. C.; AGASHE, V. R.; SIEGERS, K.; HARTL, F. U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, Boston, v.5, p.781-791, 2004.

9. VITA

Ivan Cunha Bustamante Filho, filho de Ivan Cunha Bustamante e de Nádia Gomes Bustamante, nasceu em 06 de abril de 1979, no Rio de Janeiro, RJ.

Estudou no Liceu Franco-Brasileiro no Rio de Janeiro, onde em 1994 completou o ensino fundamental. No Colégio Santo Antônio Maria Zaccaria, também no Rio de Janeiro, cursou o ensino médio. Foi aprovado em 4º lugar para cursar Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, RJ, iniciando a graduação em março de 1999. Durante o curso, foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e do Laboratório de Melhoramento Genético Animal e bolsista de trabalho, atuando no Setor de Cirurgia do Hospital Veterinário da Universidade. Graduou-se Médico Veterinário em abril de 2004, já aprovado para cursar o mestrado acadêmico em Zootecnia – Produção Animal, Área de concentração Reprodução Animal.

Em janeiro de 2006, foi aprovado em 1º lugar no processo seletivo para o curso de Doutorado no mesmo Programa de Pós-graduação. Durante o doutoramento, realizou estágio sanduíche no Genzentrum na Ludwig-Maximilians Universität München, e participou de eventos científicos no Brasil e exterior, incluindo Uruguai, Holanda e Hungria.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)