



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**

**JOÃO BATISTA CAJAZEIRAS**

**ESPERMADESINAS CAPRINAS (BODESINAS):  
PRODUÇÃO EM SISTEMA BACTERIANO**

**FORTALEZA-CEARÁ  
2009**



JOÃO BATISTA CAJAZEIRAS

ESPERMADESINAS CAPRINAS (BODESINAS):  
PRODUÇÃO EM SISTEMA BACTERIANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas.

FORTALEZA-CEARÁ  
2009

C1399e Cajazeiras, João Batista

Espermadesinas caprinas caprinas (bodesinas):  
produção em sistema bacteriano / João Batista  
Cajazeiras. \_ Fortaleza, 2009.

95 p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo  
Freitas.

Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) –  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de  
Veterinária. 1.Caprino. 2.Espermadesinas.  
3.Proteínas recombinantes. I Universidade Estadual  
do Ceará, Faculdade de Veterinária

CDD:636.39

JOÃO BATISTA CAJAZEIRAS

ESPERMADESINAS CAPRINAS (BODESINAS):  
PRODUÇÃO EM SISTEMA BACTERIANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 28/08/2009

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas  
Universidade Estadual do Ceará  
Orientador

---

Dra. Luciana Magalhães Melo  
Universidade Estadual do Ceará  
Co-orientadora

---

Prof. Dr. Gandhi Rádís-Baptista  
Universidade Federal do Ceará  
Examinador

---

Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira  
Universidade Estadual do Ceará  
Examinador

---

Dr. André Luis Coelho da Silva  
Universidade Federal do Ceará  
Examinador

A Deus,

Aos meus pais, João Cajazeiras e Maria Dalva

Aos meus irmão(ãs) Perpétuo, Lucia, Nonato,  
Márcia, Mazé, Jaqueline, Romão,  
Ricardo, Diana e Daniel

A minha amada Adriana

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudos como aluno de Doutorado.

A Universidade Estadual do Ceará (UECE), Faculdade de Veterinária (FAVET), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela oportunidade de realizar o doutorado.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), representada pelo Laboratório de Molécula Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), sob liderança do Prof. Dr. Comendador Benildo Sousa Cavada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas, pela orientação e por ter me proporcionado um amadurecimento profissional e pessoal.

A Dra. Luciana Magalhães Melo, pela dedicação, empenho e por sempre acreditar neste trabalho, mesmo nas horas mais difíceis. Devo muito a sua dedicação e não há palavras que expresse o meu mais profundo agradecimento.

Ao Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista, pela sua ajuda na elaboração deste trabalho e pelo exemplo de pesquisador.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, pela sua confiança em mim e por ter me inserido no mundo da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior que muito ajudou para meu ingresso neste programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira, pelos incentivos e conselhos durante esta grande jornada.

Aos meus pais João Cajazeiras Sobrinho e Maria Dalva Pinto Cajazeiras, que sempre me incentivaram e acreditaram nos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Perpétuo Socorro Cajazeiras, Maria Lucia Rocha, Raimundo Nonato Cajazeiras, Maria Márcia Cajazeiras, Maria José Cajazeiras, José Romão Cajazeiras, Maria Jacqueline Cajazeiras, Francisco Ricardo Cajazeiras, Ana Pinto Cajazeiras e Daniel Marcos Cajazeiras, pelo apoio e confiança em mim depositada.

A minha amada esposa que esteve tão presente durante esta tese me dando apoio pessoal e tanto amor! Por ser um presente de Deus na minha vida.

Aos amigos do curso de agronomia, Carlos Alberto Viana de Carvalho, André Luiz Coelho e ao meu compadre Eduardo Magno Leão Diógenes pelos anos de companheirismo durante a graduação e que perdura até hoje.

Aos amigos e colegas de pós-graduação do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), Raylene Moura Ramos, Alexsandra Fernandes, Karlielly de Castro Almeida, Suely Gaia Avelar, Victor Rodrigues, pelo estímulo e ajuda ilimitada.

Ao mestrando Francisco Carlos de Sousa e ao aluno de Iniciação Científica Carlos Henrique, pela ajuda na coleta de dados e pelo companheirismo.

Aos amigos e colegas de iniciação científica, Agostinho, Felipe, Antonio Carlos, Talles, Hayanne, pelo apoio e companheirismo.

A estudante de Iniciação Científica, Érica Sousa Albuquerque, pela ajuda ilimitada durante toda execução deste trabalho.

As ex-bolsistas de iniciação Científica, Camila, Sabrina e Suyanne, pela amizade durante o tempo que estiveram no laboratório.

Aos funcionários, César, Selmar e Cícero, pelo empenho e dedicação na manutenção dos animais.

A todos que, de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A baixa eficiência de purificação e da caracterização incompleta das espermedesinas (Bdhs) caprinas (*Capra hircus*) nos levou a estabelecer um sistema eficaz para produzir as recombinantes (rBdhs). O cDNA da Bdh-2 e Bdh-4 foi inserido para ser expresso em um procarioto com plasmídeo pTrcHis TOPO. O sistema pTrcHis-Bdh foi construído para produzir a proteína fusionada com a His6-tag em células de *Escherichia coli* Top 10. Os clones recombinantes foram selecionados através de crescimento em meio contendo ampicilina, amplificação por PCR e sequencia de nucleotídeo. Os insertos de cDNA foram completamente identificados e a síntese da proteína recombinante foi monitorada através de SDS-PAGE seguido por *immunoblotting* usando anticorpo monoclonal anti histidina. A expressão das ambas rBdhs foi observada utilizando concentrações de IPTG nas concentrações de 0,1 até 2,0 mM e após incubação de 2 até 6 horas. A maior produção das rBdhs ocorreu com 1,5 mM IPTG após 2 horas de indução e com 0,3 mM de IPTG após 4 horas de cultivo. Entre os tempos de indução investigado, 6 horas mostrou os menores níveis de produção para Bdh-2 e Bdh-4, onde não se observou diferenças entre as diferentes concentrações de IPTG testado. O peso molecular aparente para Bdh-2 foi de 15,85 KDa e para Bdh-4 foi de 18,17 KDa. Esse resultado está de acordo com os teóricos peso molecular de 15,5 KDa para Bdh-2 e 16,5 KDa para Bdh-4 a partir da sequencia nucleotídica. Antes deste estudo, a expressão da espermedesina recombinante em caprinos (*Capra hircus*) nunca tinha sido relatada. Assim, um sistema eficaz de expressão de rBdh em procariótico foi estabelecido a fim de proporcionar uma boa ferramenta para estudar a biofunção de espermedesinas caprinas.

**Palavras-chave:** Caprino, espermedesina, proteína recombinante

## ABSTRACT

The low purification efficiency and the incomplete characterization of buck spermadhesins (Bdhs) prompted us to establish an effective system to produce recombinant Bdhs (rBdhs). The Bdh-2 and Bdh-4 cDNA was inserted in a prokaryotic expression plasmid pTrcHis TOPO. The pTrcHis-Bdh system was constructed to produce a His<sub>6</sub> fusion protein in *E. coli* Top10 cells. The recombinant clones were selected by growth in ampicillin-containing medium, PCR amplifications and nucleotide sequencing. The inserted cDNA was completely identified and the recombinant protein synthesis was monitored by SDS-PAGE followed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. The expression of both insoluble rBdhs was achieved at 0.1 to 2.0 mM IPTG and after 2 to 6 h of induction. A greater production of both rBdhs occurred with 1.5 mM IPTG after 2 h of induction, and with 0.3 mM IPTG after 4 h of culture. Among the induction times investigated, 6 h showed the lowest levels of rBdh-2 and Bdh-4 production, where no difference was seen between the various concentrations of IPTG tested ( $P > 0.01$ ). The apparent molecular weight of rBdh-2 was  $15.85 \pm 0.09$  kDa and rBdh-4 was  $18.17 \pm 0.03$  kDa calculated by image analysis of membranes. This result agrees with the theoretical molecular weight of 15.5 kDa for Bdh-2 and 16.5 kDa for Bdh-4 predicted from the nucleotide sequence. Prior to this study, expression of recombinant buck spermadhesin had never been reported. Thus, an effective prokaryotic rBdh expression system was established in order to provide a good tool for studying the biofunctions of buck spermadhesins.

**Keywords:** Goat, spermadhesin, recombinant protein.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

- figura 1- esquema de classificação das lectinas segundo peumans e van damme (1995) e van damme *et al.* (1998). 23
- figura 2 - interação lectina-carboidrato na superfície celular. 24
- figura 3 - aparelho reprodutor masculino de caprino. 28
- figura 4 - capacitação do espermatozóide e fecundação no oviduto de mamíferos. 32
- figura 5 - eventos mediados por carboidratos durante a fecundação em suínos. 35
- figura 6 - estrutura tridimensional da sfp. nesta figura podemos verificar os quatro resíduos de cisteína formando duas pontes dissulfeto. 36
- figura 7 - estrutura tridimensional da z13. em negrito os cinco resíduos de cisteína. 37
- figura 8 - estrutura das maiores proteínas do plasma seminal de eqüinos. 38
- figura 9 - comparação da seqüência de aminoácidos do n-terminal das espermadesinas de suínos (aqn-1, awn), eqüino (awn) e bovino (asfp). 41
- figura 10 - eletroforese dos produtos das ampliações das bodesinas em tecidos do trato reprodutor do bode. 42

### CAPITULO 1

figure 1. construction and identification of ptrchis-bdh-2 prokaryotic expression vector. (a) schematic diagram of the features of ptrchis-bdh-2 vector. pbr322 ori, origin of replication; amp, ampicillin resistance gene; laciq, lac repressor gene; laco, lac operator; atg, start codon; 6×his, sequence codifying for polyhistidine tag; ek, enterokinase cleavage site; bdh-2, bdh-2 cDNA fragment; rrb term, transcription termination sequence. (b) identification of recombinant plasmid ptrchis-bdh-2 by PCR analysis. lane 1, high-range rainbow molecular weight markers (GE Healthcare); lane 2 to 6, PCR amplification products of ptrchis-bdh-2 using insert-flanking primers. 56

figure 2. nucleotide sequence of ptrchis-bdh-2 expression vector and translated amino acid sequence. the plasmid vector is shown by underlined letters. the start (atg) and the two consecutive stop codons are enclosed in grey boxes. ribosome binding site is presented in italic letters. the 6×his tag and the enterokinase recognition sequence are shown in bold letters. 57

figure 3. expression analysis of his6-fusion rbdh-2 spermadhesin in *e. coli*. total proteins of ptrchis-bdh-2 transformant were submitted to 12.5% sds-page and analyzed by immunoblotting using monoclonal anti-his antibody. cell samples were collected after 2, 4 or 6 h of iptg induction at a final concentration ranging from 0.1 to 2.0 mm. 58

figure 4. effects of iptg concentration and time of induction on relative abundance of his6-fusion rbdh-2 spermadhesin in *e. coli* expression system. bacterial samples were collected after 2 h (red bars), 4 h (blue bars) or 6 h (green bars) of iptg induction at a final concentration ranging from 0.1 to 2.0 mm. bars with different superscripts differ significantly ( $p < 0.01$ ). 59

figure 5. extraction of his6-fusion rbdh-2 produced in *e. coli* with native (a) or denaturing (b) buffer. total proteins of ptrchis-bdh-2 transformant were submitted to 12.5% sds-page and analyzed by immunoblotting using monoclonal anti-his antibody. samples of bacterial culture before (lane 1) and after (lane 2) iptg induction, as well as the insoluble (lane 3) and soluble (lane 4) fractions were used. 61

## capitulo 2

fig. 1. identification of recombinant plasmid ptrchis-bdh-4 by pcr analysis. lane 1, high-range rainbow molecular weight markers; lane 2 to 6, pcr amplification products of ptrchis-bdh-4 using insert-flanking primers. 75

fig. 2. nucleotide sequence of ptrchis-bdh-4 expression vector and translated amino acid sequence. the plasmid vector is shown by underlined letters. the two consecutive stop codons are enclosed in gray letters. nucleotide sequence encoding the n-terminal region of bdh-4 is shown in bold letters. 76

fig. 3. expression analysis of his<sub>6</sub>-fusion rbdh-4 spermadhesin in *e. coli*. total proteins of ptrchis-bdh-4 transformant were submitted to 12.5% sds-page and analyzed by immunoblotting using monoclonal anti-his antibody. cell samples were collected after 2, 4 or 6 h of iptg induction at a final concentration ranging from 0.1 to 2.0 mm. 77

fig. 4. effects of iptg concentration and time of induction on relative abundance of his<sub>6</sub>-fusion rbdh-4 spermadhesin in *e. coli* expression system. bacterial samples were collected after 2 h (white bars), 4 h (gray bars) or 6 h (black bars) of iptg induction at a final concentration ranging from 0.1 to 2.0 mm. bars with different superscripts differ significantly ( $p < 0.001$ ). 78

fig. 5. extraction of his<sub>6</sub>-fusion rbdh-2 produced in *e. coli* with native (a) or denaturing (b) buffer. total proteins of ptrchis-bdh-4 transformant were submitted to 12.5% sds-page and analyzed by immunoblotting using monoclonal anti-his antibody. samples of

bacterial culture before (lane 1) and after (lane 2) iptg induction, as well as the insoluble (lane 3) and soluble (lane 4) fractions were used.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Diferentes lectinas e seu papel fisiológico .....	25
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQN-1: Espermaesina suína

AQN-3: Espermaesina suína

aSFP: *acidic Seminal Fluid Protein* (Proteína ácida do plasma seminal)

AWN: Espermaesina suína

Bdh-1: Bodesina-1

Bdh-2: Bodesina-2

Bdh-3: Bodesina-3

Bdh-4: Bodesina-4

Bdhr: Bodesina recombinante

BSFP: *Buck Seminal Fluid Protein* (Proteína do plasma seminal do bode)

cDNA: DNA complementar ao RNA mensageiro

ConA: Lectina (*Canavalia ensiformes*)

CRD: *Carbohydrate-Recognition Domain* (Domínio de recombinantes a carboidratos)

CRISPs: *Cystein Rich Secretory Proteins* (Proteínas secretórias ricas em cisteína)

CUB: Domínio protéico

Fn-tipo II: Fibronectinas do tipo II

Fn-2: Proteína Suína

Gal $\beta$ 1-3GlcNAc: Dissacarídeos tipo 1

Gal $\beta$ 1-4GlcNAc: Dissacarídeo tipo 2

HSA: Cromossomo Humano

HSP-7: *Horse Seminal Plasma Protein* (Proteína do plasma seminal equino)

HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho

kDa: quilo Daltons

LAMP-1/2: Glicoproteínas associadas ao lisossoma

pB-1: Proteína suína

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PHA: Lectina (*Phaseolus vulgaris*)

PSP-I: Espermaesina suína I

PSP-II: Espermaesina suína II

qRT-PCR: Quantitativa Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

RIPs: Proteínas inativadoras de ribossomos

rPRT: Proteína recombinante

RSP: Espermalesina ovina

SFP: Proteína do plasma seminal

SPADH-1: Espermalesina bovina

SSC: Cromossomo Suíno

SPADH-1: Espermalesina bovina

SPADH-2: Espermalesina bovina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1 Lectinas.....	20
2.1.1 Definição .....	20
2.1.2 Histórico das Lectinas .....	20
2.1.3 Ocorrência e Classificação .....	22
2.1.4 Reconhecimento Molecular.....	23
2.2 Lectinas Animais .....	26
2.2.1 Lectina do Tipo C.....	26
2.2.1.1 Galectinas .....	26
2.2.1.2 Lectinas Endocíticas.....	26
2.2.1.3 Colectinas .....	27
2.2.1.4 Selectinas.....	27
2.2.2 Lectinas Tipo P.....	27
2.2.3 Lectinas Tipo I.....	27
2.2.4. Espermesinas .....	28
2.2.4.1 Espermesinas Suínas.....	30
2.2.4.2 Espermesinas Bovinas: .....	35
2.2.4.3 Espermesina Equina.....	37
2.2.4.4 Espermesina Ovina .....	39
2.2.4.5 Espermesinas Caprinas .....	39

<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	43
<b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> .....	45
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	46
5.1 Geral .....	46
5.2 Específicos.....	46
<b>6 CAPÍTULO I</b> .....	47
<b>7 CAPÍTULO II</b> .....	66
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	85
<b>9 PERSPECTIVAS</b> .....	86
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas que tem a capacidade de se ligar a açúcares, de forma específica e reversível. Desta forma estas proteínas apresentam a capacidade de aglutinar células e precipitar polissacarídeos ou glicoproteínas. Atualmente, a definição mais aceita sugere que lectinas são proteínas de origem não imune que contêm pelo menos um domínio não catalítico que se liga de maneira reversível a mono ou oligossacarídeos específicos, podendo ou não apresentar em sua estrutura domínios catalíticos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). A classificação das lectinas de acordo com sua especificidade por carboidratos é baseada no monossacarídeo que causa a maior inibição da aglutinação de eritrócitos induzida pela lectina, ou na precipitação de polímeros que contêm carboidratos (HAJTÓ et al., 2005). Já PEUMANS & VAN DAMME (1985; 1998) classificam as lectinas de acordo com sua estrutura geral, em três grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

Entre as lectinas de origem animal hoje é conhecido os seguintes grupos: Lectina do tipo C, dependentes de cálcio; lectina tipo – P. lectina tipo – I. Além dessas, foi descrita uma nova classe de lectinas animais, as espermedesinas, que são proteínas multifuncionais exibindo capacidade de ligação a carboidratos, inibidores de proteases, e fosfolipídios (TOPFER-PETERSEN et al., 1998). Estas proteínas já foram identificadas nos seguintes animais domésticos: suínos (TOPFER-PETERSEN et al., 1998), bovinos (EINSPANIER et al., 1991), eqüinos (REINERT et al., 1996), ovinos (BERGERON et al., 2005) e caprinos (TEIXEIRA et al., 2002).

Na espécie caprina, TEIXEIRA et al (2002, 2006) isolou e seqüenciou o N-terminal da proteína de 12,591 KDa de massa molecular, proveniente do seu plasma seminal, denominada BSFP (*Buck seminal fluid protein*) e sua purificação. Esta proteína foi caracterizada como a primeira espermedesina caprina. Essa molécula apresentou cerca de 50% de similaridade com as espermedesinas suínas AQN-1 e AWN, e não apresentou capacidade de ligação a heparina. Adicionalmente, com a continuação desses estudos quatro novos genes codificadores da família das espermedesinas caprina (*Capra hircus*), foram encontrados. Essas espermedesinas foram denominadas, bodesinas (Bdh-1; Bdh-2; Bdh-3 e Bdh-4)(MELO et al., 2008). Sendo que, a Bdh-2 foi a mais similar (87%) ao N-terminal da BSFP apresentado por TEIXEIRA et al., (2002). Após a

descoberta destes novos genes, o seu perfil de expressão para espermedesina (bodesina) caprina foi quantitativamente analisado ao longo do trato reprodutivo do macho (vesícula seminal, testículos, epidídimo, glândulas bulboretais e ductos deferentes), através da técnica de qRT-PCR (MELO et al., 2009).

O possível papel fisiológico reprodutivo destas proteínas ainda está sendo estudada. Especula-se que elas possam participar do processo de capacitação, reconhecimento e ligação entre os gametas masculinos e femininos (CALVETE et al., 1994). Na espécie suína, o heterodímero PSP-I/PSP-II contribui para a manutenção ou melhoramento da viabilidade e da motilidade dos espermatozoides (CABALLERO et al., 2005). Além disso, este heterodímero apresenta atividade pró-inflamatória e imunestimulatória para prevenir possíveis infecções do trato reprodutor baixo e prover um ambiente uterino livre de células para os embriões gerados (ASSREUY et al., 2002; ASSREUY et al., 2003; RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 2005). A espermedesina bovina: SPADH-1 (aSFP) parece proteger o espermatozoide contra lesões oxidativas, reduzindo a peroxidação lipídica (SCHONECK et al., 1993). Já a espermedesina eqüina, HSP-7, tem a capacidade de ligar-se a carboidratos da zona pelúcida, podendo assim, desempenhar um importante papel como molécula de adesão primária, nas etapas iniciais do processo de fecundação (TOPFER-PETERSEN & CALVETE, 1996; TOPFER-PETERSEN et al., 2005a). A espermedesina caprina por ser similar a proteína eqüina, HSP-7, apresenta a possibilidade de aplicações biotecnológicas.

Na espécie caprina, o baixo volume do plasma seminal dessa espécie tornou-se um obstáculo como fonte de espermedesina para estudos na área de reprodução, bioquímica e aplicações biotecnológicas. Tornando-se necessário a produção de proteínas recombinantes.

Assim, torna-se importante a obtenção das espermedesinas recombinantes (Bdhr), viabilizando a produção em larga escala. Adicionalmente, nesse sentido, sistema heterólogo bacteriano apresenta-se como uma alternativa promissora.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Lectinas

#### 2.1.1 Definição

Lectinas são proteínas que tem a capacidade de se ligar a açúcares, de forma específica e reversível. Desta forma estas proteínas apresentam a capacidade de aglutinar células e precipitar polissacarídeos ou glicoproteínas. Atualmente a definição mais aceita sugere que lectinas são proteínas de origem não imune que contêm pelo menos um domínio não catalítico que se liga de maneira reversível a mono ou oligossacarídeos específicos, podendo ou não apresentar em sua estrutura domínios catalíticos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Algumas lectinas, por serem monovalentes apresentam um único sítio de ligação a carboidratos, não possuindo a habilidade de aglutinarem células, podendo apresentar um ou mais sítios que não ligam carboidratos (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

#### 2.1.2 Histórico das Lectinas

O primeiro estudo sobre lectinas foi realizado por Stilmark (1888), na Rússia, que, quando toxicidade de sementes de mamona (*Ricinus communis*), ligou essa toxicidade à ocorrência de um fator protéico hemaglutinante, denominando-o Ricina, descrevendo pela primeira vez em bioquímica de plantas uma proteína com atividade biológica bem definida.

Posteriormente, observou-se efeitos hemaglutinantes similares ao da ricina, estudando uma proteína das sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti), a abrina. Numerosas substâncias aglutinantes tóxicas e não tóxicas foram descobertas depois em outras plantas.

Foi então, no ano de 1919 que se obteve a primeira lectina na forma cristalizada, descoberta por James B. Summer, a partir de sementes de *Canavalia ensiformes*, a *Concavalina A* (ConA). Na década de 40, os investigadores Rose M. Reguera e William C. Boyd, reportaram que certas sementes contem aglutininas específicas para antígenos dos grupos sanguíneos humanos. Observaram que extratos de

*Phaseolus lunatus* aglutinavam seletivamente eritrócitos do grupo A e descreveram que, dentre extratos de sementes de 57 diferentes espécies, havia diversos com especificidade para grupos sanguíneos particulares.

O primeiro a usar o termo lectina (do latim *legere*, escolher, selecionar) foi Boyd & Shapleigh em 1954 ao observar que algumas aglutininas obtidas de sementes de plantas podiam reconhecer um grupo específico e aglutiná-lo. Foi somente a partir de 1970 que as lectinas passaram a ser tema de investigação de vários grupos de pesquisa.

O crescente aumento em pesquisas com lectinas parece ter relação com a descrição de suas propriedades biológicas; a lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA), por exemplo, uma das lectinas mais investigadas, quando imobilizada em agarose, é utilizada para isolamento de polissacarídeos e glicoproteínas; Lectinas de *Dolichos biflorus* e de *Vicia graminea* são utilizados em bancos de sangue para identificação de hemácias do grupo A e N, respectivamente. Lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) está sendo testada para tentar melhorar a maturação *in vitro* de oócitos bovinos (WANG et al, 2001).

Dois aspectos de organização das lectinas auxiliam na compreensão do papel que exercem: o primeiro se refere ao fato de que a atividade ligante a açúcar é atribuída a uma porção limitada da molécula, correspondendo tipicamente a um domínio globular de reconhecimento de carboidrato (CRD), de menos de 200 aminoácidos; o segundo, diz respeito a que os CRDs de muitas das lectinas relacionam-se entre si, quanto à sequência de aminoácidos, o que faz com que as lectinas conhecidas, em sua grande maioria, possam ser reunidas em um número relativamente pequeno de grupos (WEIS & DRICKAMER, 1996).

CAVADA et al. (2001) demonstraram que lectinas de especificidade semelhantes por carboidratos pode, em alguns casos, apresentar afinidade pelo ligante diferenciado, sugerindo que algum tipo de diferença estrutural entre as lectinas pode ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido entre lectinas – ligante, e isto se refletir na potencia das atividades biológicas desempenhadas por estas proteínas.

### 2.1.3 Ocorrência e Classificação

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, pois além de serem detectadas em plantas superiores, já foram isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos: algas, vertebrados, invertebrados e microorganismos, incluindo fungos e vírus, apresentando uma grande variedade de formas e tamanhos. Muitas destas proteínas podem ser agrupadas em famílias distintas que exibem similaridade quanto às propriedades estruturais e de seqüência de aminoácidos em suas cadeias polipeptídicas.

A mais recente definição de lectinas foi proposta e discutida por PEUMANS e VAN DAMME (1995), segundo o qual, lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um sítio de ligação reversível a carboidratos. Esta definição adquire credibilidade ao observarmos a subdivisão deste vasto grupo de proteínas proposta pelos mesmos autores, que as dividem em três classes principais de lectinas (figura 1):

- **Merolectinas:** inclui lectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato e, conseqüentemente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como exemplo, podemos citar as proteínas monoméricas das orquídeas.
  
- **Hololectinas:** compreende aquelas lectinas que tem dois ou mais sítios de ligação a um mesmo carboidrato, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Essa classe de lectinas está representada pelas hemaglutininas ou fitohemaglutininas.
  
- **Quimerolectinas:** engloba as lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de apresentarem atividade catalítica (ou outra atividade biológica não carboidrato ligante) associada a um outro domínio molecular, portanto, diferente do sítio de ligação a carboidrato. Como representantes dessa classe, podem ser citadas as RIPs.

Em 1998, os mesmos autores introduziram uma nova classe de lectinas, as **superlectinas**, que possuem dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são, estruturalmente, diferentes e reconhecem açúcares não relacionados (Figura 1). Um

exemplo desse grupo é a lectina de tulipa TxLC-1 (*first Tulipa hybrid lectin with complex specificity*) que possui subunidades com um sítio específico para manose e outro para N-acetil-galactosamina, atuando de maneira totalmente independente. (VAN DAMME *et al.*, 1996).

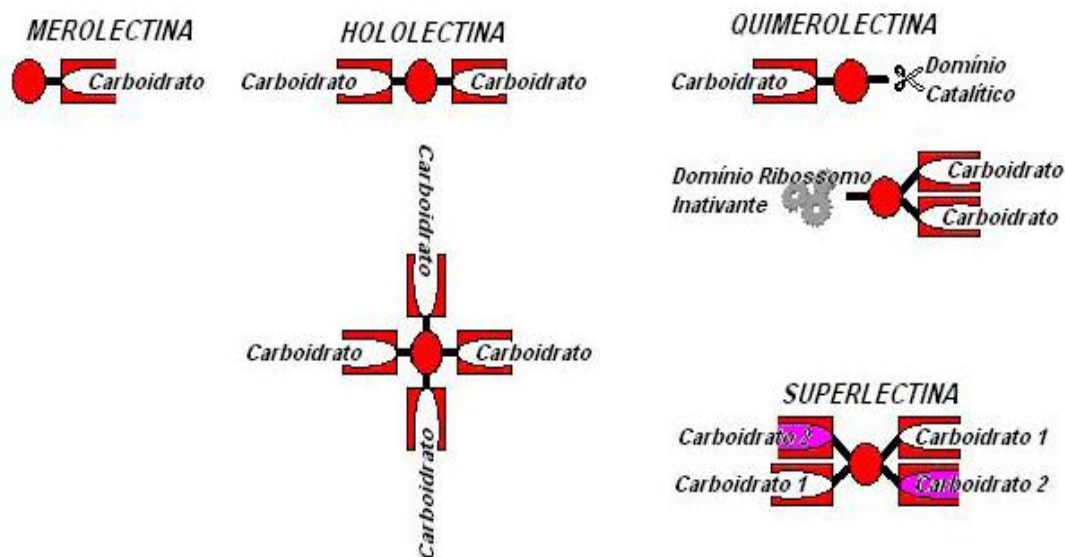


Figura 1- Esquema de classificação das lectinas segundo PEUMANS e VAN DAMME (1995) e VAN DAMME *et al.* (1998).

### 2.1.4 Reconhecimento Molecular

As lectinas, de uma forma mais ampla, possuem uma ampla capacidade de agir como reconhecedor de moléculas dentro de células, na superfície celular e, em fluidos fisiológicos (figura 2 e tabela 1). sendo de fato, a visão atual da função biológica das lectinas.

A aplicabilidade das lectinas oferece muitas vantagens, considerando sua alta estabilidade e suas distintas especificidades, o que possibilita seu uso como uma importante ferramenta tanto para propósito analítico como preparativos em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas correlatas. O uso das lectinas em áreas clínicas e na agricultura também teve um desenvolvimento significativo. O emprego de lectinas como ferramentas biotecnológicas tem sido cada vez mais ampliada, indo desde

reagentes no isolamento de substâncias contendo açúcares como biofatores e em bioensaios (SHARON & LIS, 2004).

Lectinas servem como meio de fixação de diferentes tipos de células, como vírus, para outras células, através da superfície de carboidratos. Em alguns casos, lectinas da superfície celular se ligam particularmente em glicoproteínas, enquanto que em outros casos o carboidrato de glicoproteínas da superfície celular ou glicolipídios servem como sítio para se ligar a molécula biologicamente ativa, como as lectinas.

Como tem sido demonstrado, durante mais de 120 anos, estudos sobre lectinas tem percorrido um longo caminho, desde a sua primeira detecção em plantas como hemaglutininas ao seu estado atual como molécula reconhecida com funções excitantes e aplicações biotecnológicas (SHARON & LIS, 2004).

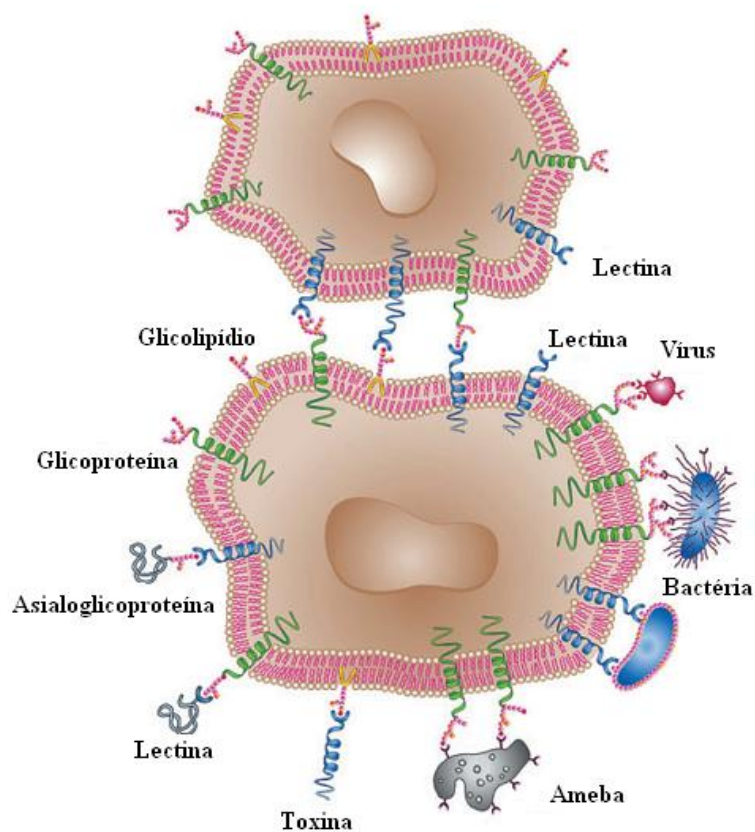


Figura 2 - Interação lectina-carboidrato na superfície celular. Adaptado de SHARON et al., (2004).

Tabela 1 - Diferentes lectinas e seu papel fisiológico.

<b>Lectina</b>	<b>Papel Fisiológico</b>
<b>MICROORGANISMOS</b>	
Ameba	Infecção
Bactéria	Infecção
Influenza virus	Infecção
<b>PLANTAS</b>	
Várias	Defesa
Leguminosas	Simbiose com bactérias fixadora de nitrogênio
<b>ANIMAL</b>	
Calnectin, Calreticulin	Controle de biossíntese de glicoproteínas
ERGIC-53	
Colectinas	Imunidade
Dectinas-I	Imunidade
Galectinas	Regulação das células de crescimento e apoptose; regulação dos ciclos celulares, modulação célula-célula e interação substrato célula
Macrófagos receptores de manose	Imunidade
Receptor manose-6-P	Contato das enzimas lisossomais
Selectina-L	Direcionamento dos linfócitos
Selectina E e P	Carreamento de linfócitos para os locais de inflamação
Siglecs	Interação célula-célula em sistemas imunes e neurais
Espermadesinas	Interação espermatozóide/oócito

Fonte: SHARON et al., (2004).

## **2.2 Lectinas Animais**

Entre as lectinas do reino animal hoje é conhecido os seguintes grupos principais:

### **2.2.1 Lectina do Tipo C**

Apresentam como peculiaridade, o fato de só ter sua atividade biológica manifestada na presença de cálcio. Já foram descritos 50 membros desta classe e todas estas lectinas apresentam um domínio extracelular de reconhecimento a carboidratos (CRD). As lectinas desta classe estão agrupadas em três famílias: as lectinas endocíticas, as colectinas e as selectinas (LIS & SHARON, 1998).

#### **2.2.1.1 Galectinas**

As lectinas animais deste grupo apresentam um papel de adesão. Elas foram localizadas tanto no citoplasma como no núcleo em diferentes tipos celulares e ocasionalmente, também, são encontradas em superfície e fora da célula (LEFFLER et al., 2004).

Elevados níveis de galectina-3 estão presentes na superfície de células cancerígenas em metástase de camundongos e do homem, pois estas lectinas podem ser responsáveis pela adesão das células no organismo, sendo uma etapa necessária para a metástase (LIS & SHARON, 1998).

#### **2.2.1.2 Lectinas Endocíticas**

As lectinas endocíticas são uma classe de lectinas do tipo –C que funcionam como receptor de membrana com diferentes especificidades como N-acetilgalactosamina, galactose e manose-específica. As lectinas endocíticas do tipo II são proteínas transmembranais, constituída de um domínio citoplasmático N-terminal, uma hidrofobicidade, um domínio de membrana e uma região C-terminal composta pelo domínio CRD (LIS & SHARON, 1998).

### **2.2.1.3 Colectinas**

As colectinas possuem uma função similar às galectinas, porém diferem no mecanismo, que é realizado por MBP's no soro e fígado de mamíferos. Estas lectinas ligam-se em oligomanosídios de microorganismos infectantes, causando ativação do sistema complemento sem a participação de anticorpos, e subsequente lise de patógenos (LIS & SHARON, 1998).

### **2.2.1.4 Selectinas**

As selectinas formam outra família de lectinas tipo-C. Essas lectinas participam do papel de interação de açúcar com lectina no reconhecimento biológico. As selectinas mediam a adesão dos leucócitos em circulação para células endoteliais do sangue, um pré-requisito para a migração dos leucócitos para os tecidos. Este controle regula o tráfico do leucócito para os sítios inflamatórios e a migração dos linfócitos para os órgãos linfóides. As selectinas são divididas em três tipos: as selectinas – L (90-110 KDa), selectinas – E (115 KDa), selectinas-P (140 KDa).

### **2.2.2 Lectinas Tipo P**

Estas lectinas tem a função dos receptores de manose-6-fosfato, onde esse processo é mediado pelo reconhecimento entre manose-6-fosfato, presentes em unidades de oligomanose de enzimas, e receptores (SHARON & LIS, 2004).

### **2.2.3 Lectinas Tipo I**

Estas lectinas podem estar relacionadas com a interação célula-célula. Em todas estas lectinas, a porção N-terminal possui um domínio extracelular similar.

Além dessas, foi descrita uma nova classe de lectinas animais, as espermedesinas, que estão presentes no plasma seminal ou, periféricamente, associadas a superfície de espermatozóides, de vários mamíferos, durante a ejaculação. Tem-se

atribuído a essa nova classe um papel nas etapas de capacitação do espermatozóide e na ligação inicial deste a glicoconjugados da zona pelúcida de oócitos homólogos, durante o processo de fertilização (CALVETE, et al, 1995c).

#### 2.2.4. Espermadésinas

O plasma seminal é uma mistura complexa proveniente do epidídimo e de várias glândulas acessórias em que os espermatozoides estão suspensos no plasma seminal. (THIBAULT et al., 1993)(Figura 3). As proteínas que compõem o plasma seminal variam de espécie para espécie. Estes componentes têm um importante efeito na função espermática, influenciando na habilidade do espermatozóide de fertilizar, e exerce efeito na fisiologia reprodutiva da fêmea (TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

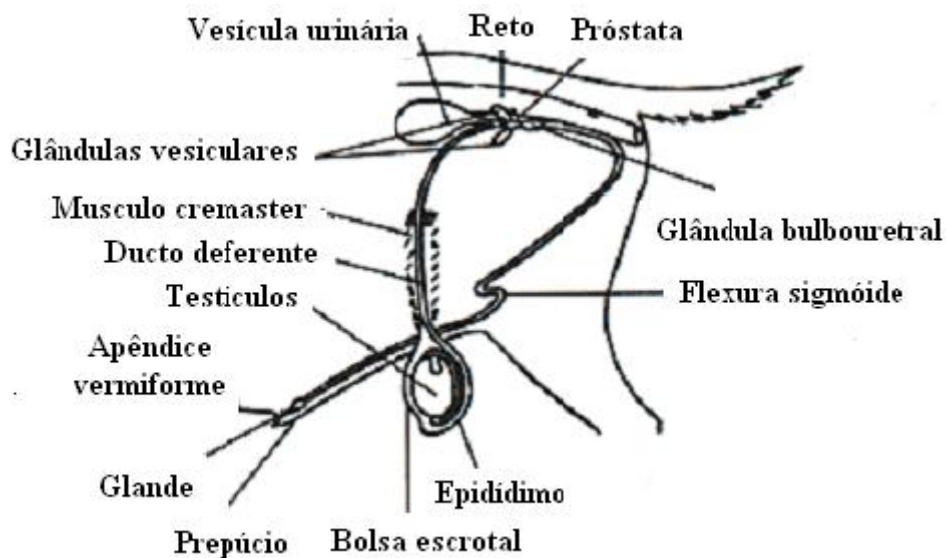


Figura 3 - Aparelho reprodutor masculino de caprino. Adaptado de GRANADOS et al., (2006).

As principais proteínas do plasma seminal de espécies unguladas pertencem a três classes de proteínas amplamente distribuídas: fibronectinas do tipo II (Fn-tipo II), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) e espermedesinas (TOPFER-PETERSEN et al., 2005b).

Entre as várias proteínas existentes no plasma seminal conhecidas, que apresentam a capacidade de se ligar a carboidratos da zona pelúcida encontram-se as espermedesinas, um grupo de 110-113 resíduos de polipeptídios, surgindo como uma nova proteína da família das lectinas animal (TOPFER-PETERSEN et al., 1999; DOSTÀLOVÀ et al., 1995).

Espermedesinas são um grupo de polipeptídeos de 12 a 16 KDa encontrado no plasma seminal e perifericamente associado com a superfície do espermatozóide de animais domésticos, como suínos, bovinos e eqüinos (CALVETE et al., 1995b; REINERT et al., 1996; TEDESCHI et al., 2000), que são capazes de interagir com algum receptores de açúcar que se encontra na superfície celular. A capacidade de se ligar a moléculas de açúcar é uma característica da atividade biológica das proteínas da família das lectinas e lectina-like. Todas as lectinas animais contem um domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) em sua sequência de aminoácidos. Entretanto, as espermedesinas diferem estruturalmente da maioria das lectinas. Elas são caracterizadas por apresentarem um domínio CUB (ROMERO et al., 1996). Esta sigla é devido às proteínas onde estes domínios foram primeiramente identificados (BORK & BECKMAN, 1993): C de subcomponentes do complemento (Clr, Cls), U de proteína do embrião do ouriço-do-mar (Uegf) e B de proteína 1 morfogenética do osso (Bmp1).

A função biológica destas proteínas ainda está sendo estudada, apresentando a capacidade de se ligar a carboidratos, também pode atuar como inibidores de proteinases e fosfolipídeos (TOPFER-PETERSEN et al., 1998) ou, atuar como lectinas ligadoras de glicoproteínas da zona pelúcida, durante a etapa da fecundação (DOSTÀLOVÀ et al., 1994a; CALVETE et al., 1994).

Até o presente momento já foram encontradas espermedesinas nas seguintes espécies domésticas: espermedesinas suínas (AWN, AQN-1, AQN-3, PSP-I e PSP-II) (HAASE et al., 2005); espermedesinas bovina (SPADH-1 e SPADH-2) (EINSPANIER et al., 1991); espermedesina eqüina (HSP-7) (REINERT et al., 1996); espermedesina

ovina (RSP) (BERGERON et al., 2005) e espermedesina caprina (BSFP)(TEIXEIRA et al., 2002; MELO et al., 2008).

#### 2.2.4.1 Espermedesinas Suínas

Na espécie suína, a proteína da família das espermedesinas apresenta o maior número de membros, perfazendo um total de cinco genes: AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I, PSP-II e suas isoformas glicosiladas (SANZ et al., 1991, 1992a; KWOK et al., 1993a) que estão localizadas no SSC 14q28-q29 em uma região sintética para HSA 10q26 (HAASE et al., 2005).

As proteínas AQN e AWN possuem uma nomenclatura baseada nos três primeiros resíduos de aminoácidos de sua sequência: alanina (A), glutamina (Q), asparagina (N) e triptofano (W); sendo que, os números indicam a posição de eluição destes peptídios em coluna de HPLC de fase reversa. Essas proteínas são encontradas na região acrossomal de espermatozoides epididimário e classificadas como proteínas de superfície do espermatozóide (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1998; JONÁKOVÁ et al., 1998; SANZ et al., 1991; 1992b, c e d).

Vários estudos têm procurado desvendar a origem celular das espermedesinas. Intensas investigações na espécie suína têm indicado a vesícula seminal como principal fonte produtora das espermedesinas, embora estas proteínas suínas são sintetizadas também pelo epidídimo e glândulas do trato genital masculino (KWOK et al., 1993b; DOSTÀLOVÀ et al., 1994b; SINOWATZ et al., 1995; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2002; TOPFER-PETERSEN et al., 2005b). Abordagens investigativas através de RT-PCR, *Western blot* e imunohistoquímica têm identificado a presença das espermedesinas suínas em vesículas seminal, próstata, epidídimo e testículo (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2002; HOSHIBA & SINOWATZ, 1998). Todas as cinco espermedesinas são transcritas e traduzidas em vesícula seminal, próstata e cauda do epidídimo. Enquanto que, em testículo, somente foram detectados transcritos de PSP-I e PSP-II (EKHLASI-HUNDRIESER, et al., 2002). Curiosamente, AWN não é expressa somente no epidídimo e vesícula seminal, mas também na tuba uterina do trato genital feminino (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2002). A estrutura e a função das espermedesinas tem sido exaustivamente investigadas em suínos. As espermedesinas

desta espécie apresentam em torno de 110-113 resíduos de aminoácidos, compreendido em um único domínio CUB. Este domínio é estabilizado através de duas pontes dissulfeto entre resíduos de cisteínas vizinhas e apresentam cerca de 40 a 60% de similaridade em suas estruturas primárias (CALVETE et al., 1995b). A estrutura cristalina de dois membros da família das espermedesinas revelou pela primeira vez, conhecimentos sobre a estrutura de um domínio CUB. A estrutura global consiste de um sanduiche feito de duas folhas  $\beta$  (ROMERO et al., 1997; ROMÃO et al., 1997; VARELA et al., 1997).

Espermedesinas são proteínas com uma vasta variedade de possíveis interações bioquímicas. Esta proteína exibe uma extensa capacidade para se ligar a heparina, inibidores de proteinases, fosfolípidios e carboidratos, que tem sido atribuído para diferentes atividades biológicas. Variação na sequência, glicosilação e a agregação estável da espermedesina modulam sua função específica (TOPFER-PETERSEN et al., 1998; CALVETE & SANZ, 2007). Por exemplo, AWN, AQN-1 e AQN-3 são proteínas que se ligam ao espermatozóide, que parece estar envolvido na interação com carboidratos para a fecundação. A proteína AQN está ligada predominantemente na superfície da cabeça espermática e tem sido demonstrada sua contribuição para a formação do reservatório espermático ovidutal através da interação com glicoconjugados do epitélio do oviduto. (WAGNER et al., 2002; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005). AWN permanece vinculado a região Peri-acrossomal da membrana plasmática espermática após o transporte através do trato genital feminino, da capacitação *in vivo* e pode estar associada no reconhecimento de gametas (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1998)(Figura 4).

No que diz respeito às interações bioquímicas, apenas a AWN-1 e AQN-3 não são capazes de interagir com a matriz fosforil-etanolamina, sendo um dos principais substituintes da membrana espermática de varrões (WATSON, 1981). Sugerindo que estas espermedesinas podem ligar-se diretamente aos lipídios da membrana espermática. (DOSTALOVA et al., 1995b). Agregados de espermedesinas poderiam então tornar-se revestidas no topo desta primeira camada, servindo como fatores de estabilização que protegem a membrana acrossômica imatura de uma possível reação acrossômica. Estas espermedesinas são cogitadas para estabilizar a membrana plasmática durante a reação

acrossômica e são liberadas a partir da superfície espermática principalmente durante a capacitação. (SANZ et al., 1993; DOSTALOVA et al., 1994; CALVETE et al., 1997).

AQN-1 liga-se a membrana lipídica do espermatozóide através de mecanismo indireto. Isto forma um heterodímero com a proteína suína tipo Fn-2, pB1, que pode se associar ao espermatozóide através da membrana ligando-se a fosforilcolina por meio do sítio da pB1 (CALVETE et al., 1997; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2007).

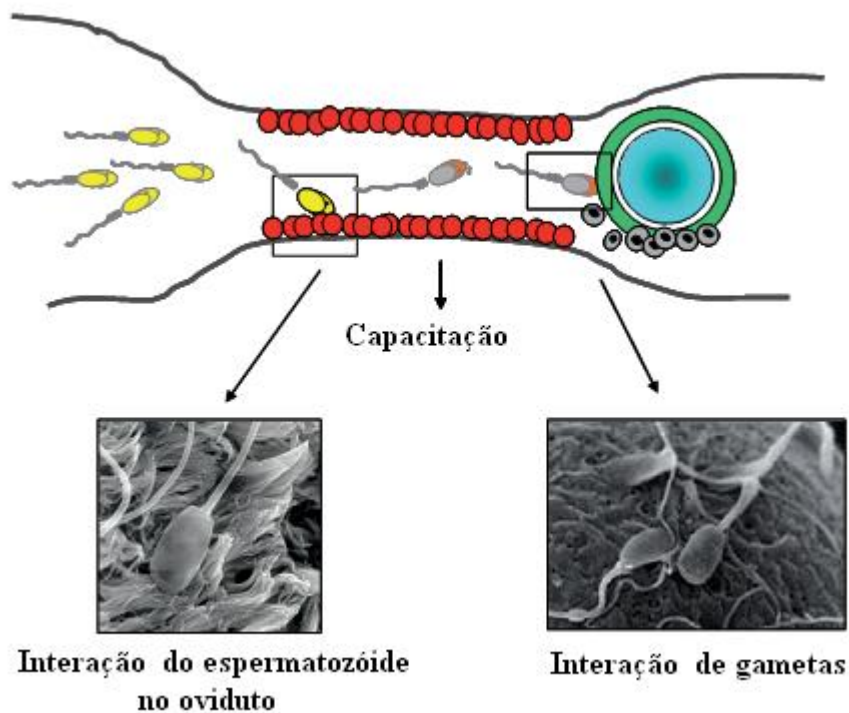


Figura 4 - Capacitação do espermatozóide e fecundação no oviduto de mamíferos.  
Adaptado de TOPFER-PETERSEN et al., (2008)

As espermedesinas PSP-I e PSP-II (*Porcine seminal Protein*) são as mais abundantes proteínas do plasma seminal de suíno (NIMTZ et al., 1999), representando mais de 50% da fração composta pelas espermedesinas (KWOK et al., 1993). A PSP-I e PSP-II isoladas tem a capacidade de se ligar a heparina. Embora, na forma heterodímera glicosilada esta interação a heparina não ocorre. Além disso, o heterodímero e a subunidade PSP-II, mas não a PSP-I, apresentam afinidade por inibidor de tripsina e glicoproteínas da zona pelúcida (CALVETE et al., 1995c)

Recentes estudos evidenciam uma função imunossupressiva para a glicofoma PSP-I e PSP-II. Elas são imuno-estimulatório para atividade de linfócitos *in vitro* (NIMTZ et al., 1999) e evita uma possível infecção do trato reprodutor baixo e fornece uma estratégia para prover um ambiente uterino livre de células para os embriões gerados (ASSREUY et al., 2003). Além disso, essas espermedesinas têm mostrado exercer influências na qualidade de espermatozóides altamente diluídos para fins biotecnológicos (CENTURIÓN et al., 2003; CABALLERO et al., 2004; GARCIA et al., 2006). Assim, o heterodímero PSP-I-PSP-II contribuiu para a manutenção ou incremento de viabilidade e da modalidade dos espermatozóides, (CABALLERO et al., 2004), além da atividade mitocondrial (CENTURIÓN et al., 2003), sem exercer efeito sobre a região acrossômica das células. Esses benefícios são amplamente preservados com o uso da subunidade isolada PSP-II e não parece requerer a parte glicídica da molécula (GARCIA et al., 2006). Tais descobertas apontam para potencial utilização dessas proteínas como aditivo ao meio diluidor de sêmen, podendo incrementar os parâmetros espermáticos. Além disso, não parece haver influência desta espermedesina sobre a capacidade de fecundação *in vitro* dos espermatozóides previamente incubados com a proteína (CABALLERO et al., 2004). No entanto, quando PSP-I/PSP-II é acrescentada ao meio de maturação dos oócitos, ou ao meio de fecundação, ocorre acentuada diminuição na taxa de fecundação, bem como no número de espermatozóides circundando os oócitos. Não se sabe se esses efeitos inibitórios são exercidos diretamente sobre os espermatozóides ou bloqueando os receptores na zona pelúcida (glicoproteínas) do oócito (CABALLERO et al., 2005).

A característica marcante da espermedesina suína é sua capacidade de se ligar a carboidratos, que tem sido investigado muito intensivamente. Os mecanismos básicos para o reconhecimento a carboidrato têm verificado que eles diferem entre si em várias

espécies. As espermedesinas suínas reconhecem um amplo espectro de oligossacarídeos, enquanto a família da espermedesina bovina, não apresenta uma ligação a carboidrato característico. (TOPFER-PETERSEN et al., 1998). Espermedesinas suínas isoladas se ligam aos seus possíveis substratos naturais – glicoproteínas da zona pelúcida e glicoproteínas ovidutal. AWN e AQN-3 mostraram afinidade equivalente de ligação para glicoproteínas que apresentam Gal $\beta$ 1-3GlnAc e Gal $\beta$ 1-4GlcNAc em sua sequência N-terminal.

Os eventos no oviduto levando a uma possível fertilização envolvem uma sequência de mecanismos de reconhecimento a carboidrato. Para os suínos, baseado no conhecimento atual, um modelo de interação é mostrado na figura 5. Espermatozóide não capacitados são capturados no reservatório espermático no oviduto por meio de ligação flexível a manose, exposto por glicoproteínas ovidutal, como LAMP-1/2 e proteínas desconhecidas de 130 KDa que são reconhecidas pela superfície espermática associada a espermedesina AQN-1 (TOPFER-PETERSEN et al., 2008). Na primeira etapa da capacitação, estas proteínas são vertidas a partir da superfície, assim como, desmascaramento de receptores multiméricos complexos como AWN, AQN e P47/SE na superfície espermática. Durante o percurso para o sítio de fertilização, os espermatozóides concluem a capacitação e liga-se a zona pelúcida do oócito ovulado por reconhecer devidamente complexos N-glicanos das glicoproteínas da zona pelúcida. Após a ligação, a reação acrossômica é induzida porque o intraacrossoma pro-acrosina (p38) está exposto e ativado. A pró-acrosina se liga a estruturas glicanas de polisulfato da zona pelúcida e media a segunda ligação do acrossoma espermático na matriz. Acrosina pode ser um ciclo alternativo para o processo de penetração (O'RAND et al., 1986): O segundo evento de ligação, a proteólise limitada da zona pelúcida e a liberação do espermatozóide a partir da matriz (Figura 5).

Além disso, acredita-se que a zona pelúcida é submetida a um processo de maturação durante o desenvolvimento do oócito para uma fertilização competente (TOPFER-PETERSE, et al., 2008).

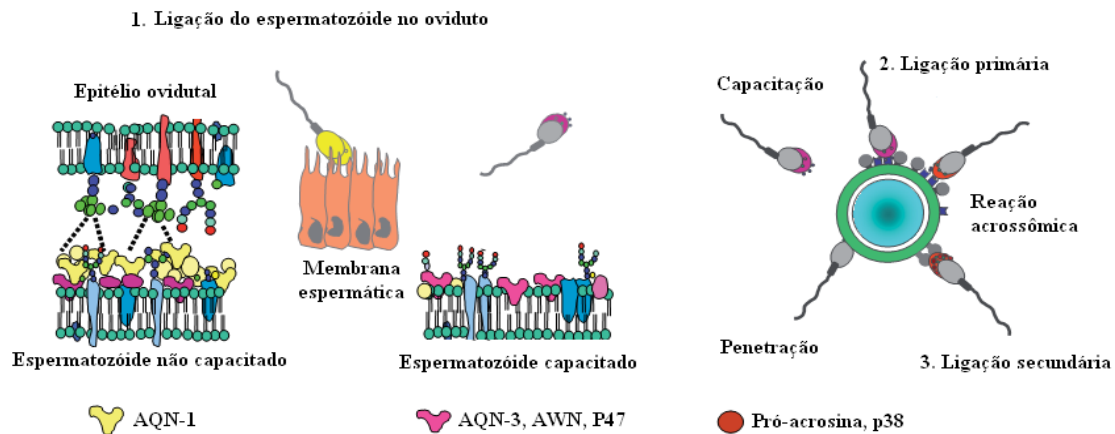


Figura 5 - Eventos mediados por carboidratos durante a fecundação em suínos. Adaptado de TOPFER-PETERSEN et al., (2008).

#### 2.2.4.2 Espermadesinas Bovinas:

A espermadesina aSFP (*acidic seminal fluid protein*) é um peptídeo não glicosilado de 12,9 KDa, purificada a partir do plasma seminal bovino (EINSPANIER et al., 1991). Esta proteína é principalmente expressa na vesícula seminal e em menor proporção no epidídimo, não tendo sido detectada em nenhum outro tecido bovino. (EINSPANIER et al., 1991). No animal adulto, a aSFP é o principal componente do fluido seminal, sendo sua concentração na faixa de 2 a 7 mg/mL (DOSTÀLOVÀ et al., 1994a; EINSPANIER et al., 1993).

A aSFP tem sido detectada também em outros tecidos animais como caprinos, ovinos, suínos, ratos, cães e humanos (EINSPANIER et al., 1994; WENPE et al., 1992).

A estrutura primária de aSFP demonstra ser esta proteína composta por 114 resíduos de aminoácidos, unidos por duas pontes dissulfeto (EINSPANIER et al., 1994). Por outro lado, aSFP liga-se mais frouxamente à superfície do espermatozóide bovino no ejaculado, sendo quantitativamente liberada durante a capacitação *in vitro* (DOSTALOVA et al., 1994a). A aSFP, além de fraca ligação à membrana do espermatozóide, não apresenta capacidade de ligação à zona pelúcida, o que indica que a mesma não está envolvida na interação de gametas. Por outro lado, em concentrações

fisiológicas, a aSFP parece proteger o espermatozóide contra lesões oxidativas por reduzir a peroxidação lipídica (SCHONECK et al., 1993). Além disso, a aSFP parece estimular de forma dose-dependente a divisão celular de linfócitos estimulando a secreção de progesterona pelo endométrio bovino e pelas células ovarianas (EINSPANIER et al., 1991).

Após a cristalização, a estrutura tridimensional de aSFP foi determinada (Figura 6), sendo quase idêntica à das espermadesinas suínas PSP-I e PSP-II. No entanto, algumas características exclusivas para esta proteína foram demonstradas, o que pode explicar as diferentes propriedades biológicas dos diferentes membros da família das espermadesinas (ROMÃO et al., 1997), além desta proteína do plasma seminal bovino foi descrito um grupo de proteínas denominadas BSP (isoformas A1, A2 e A3), coletivamente conhecidas como MP (*Major Proteins*) ou PDC-109.

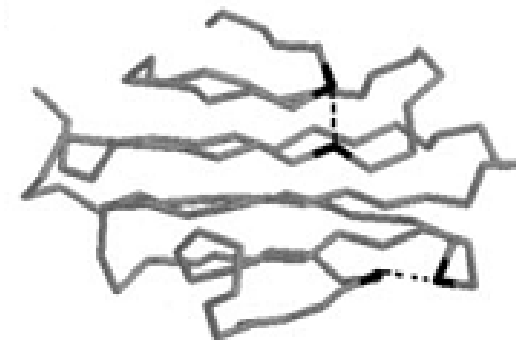


Figura 6 - Estrutura tridimensional da SFP. Nesta figura podemos verificar os quatro resíduos de cisteína formando duas pontes dissulfeto. Adaptado de TEDESCHI et al., (2000).

Recentemente uma nova proteína da família das espermadesinas do plasma seminal de bovino foi purificada, sendo denominada de SPADH-2 ou Z13. É um polipeptídeo não-glicosilado de 13 KDa, sem afinidade por heparina. Apresenta 116 resíduos de aminoácidos, os quais apresentam 53% de similaridade com a aSFP. Apesar disso, a mais significativa diferença entre Z13 e as outras espermadesinas encontra-se na existência de um quinto resíduo de cisteína (C89) na primeira molécula. Assim,

quando em solução aquosa, Z13 provavelmente apresenta-se como um homodímero com uma ponte dissulfeto intercadeia envolvendo os resíduos C89 de cada molécula (TEDESCHI et al., 2000)(Figura 7).

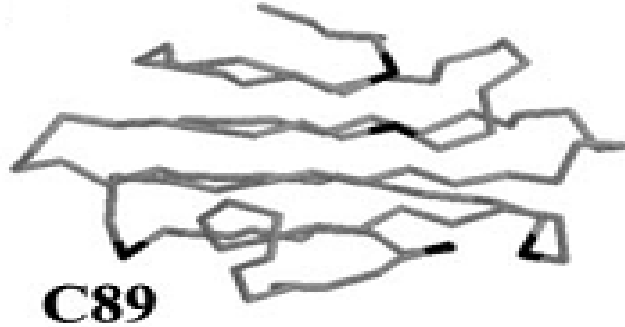


Figura 7 - Estrutura tridimensional da Z13. Em negrito os cinco resíduos de cisteína. Adaptado de TEDESCHI et al., (2000).

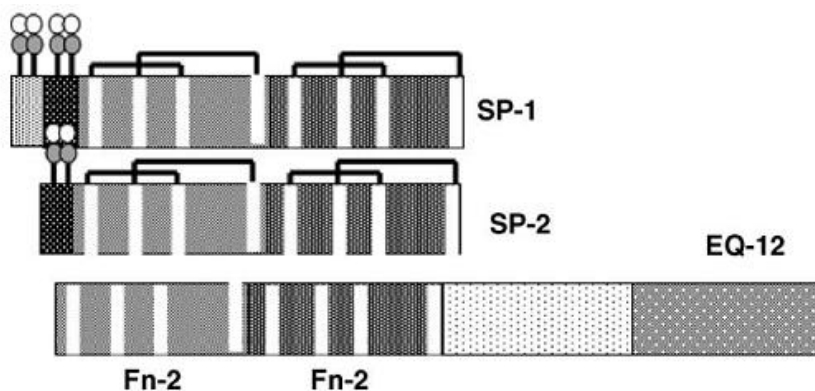
#### 2.2.4.3 Espermaesina Equina

O sucesso da reprodução depende de uma cascata de eventos, primeiro da espermatogênese, da espermiogênese e da maturação espermática. Depois, durante a ejaculação, diferentes secreções provenientes das glândulas acessórias dos machos promoverão mudanças importantes na composição da membrana espermática e nas proteínas de superfície. Na sequência, os espermatozoides deverão ser capacitados, durante sua passagem pelo trato genital feminino, e sofrerem a reação do acrossoma até que um deles seja capaz de penetrar a zona pelúcida e finalmente se fundir com o oócito. Cada um destes passos é mediado por um número de proteínas e, conseqüentemente, por genes (LEEB et al., 2005). Estas proteínas específicas já foram identificadas nos eqüinos, como a família das proteínas ricas em cisteína (CRISPs), a família de proteínas com o número variável de domínios de fibronectinas do tipo II (Fn-II) e a família das espermaesinas (LEEB et al., 2005)(Figura 8).

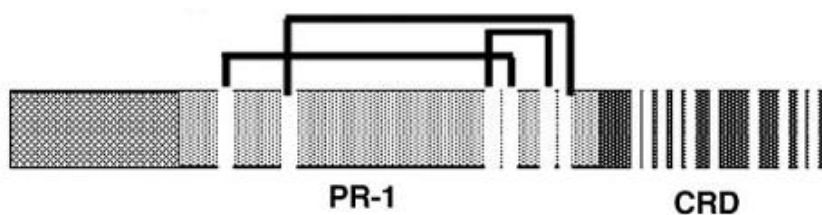
Nos equinos, a proteína da família das espermedesinas é representada pela HSP-7, sendo que ela se liga a zona pelúcida intacta, mostrando seu papel na interação espermatozóide-zona pelúcida (REINERT et al., 1996). A HSP-7 é secretada durante o trajeto do espermatozóide pelo ducto epididimário e se liga ao espermatozóide formando uma banda proeminente na região equatorial (TOPFER-PETERSEN, 2005a)

A HSP-7 ou SSP-7 (*Stallion Seminal Plasma Protein*) foi isolada do plasma seminal de cavalos (REINERT et al., 1996) e apresenta sequência de aminoácidos similar à espermedesina suína AWN, com diferença de apenas três aminoácidos (REINERT et al., 1996; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2002).

### Proteína com domínio Fn-2



### Família das CRIS



### Família das espermedesinas

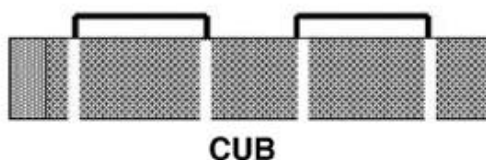


Figura 8 - Estrutura das maiores proteínas do plasma seminal de equinos. Adaptado de LEEB et al., (2005)

#### **2.2.4.4 Espermedesina Ovina**

Em ovinos, o isolamento de proteínas do plasma seminal ocorreu através de cromatografia de afinidade em coluna com gel de agarose, duas frações foram eluídas. Sendo que na primeira fração foi identificada a presença de uma proteína com 15,5 KDa, sendo a maior proteína do plasma seminal, representando 45% da proteína total. Esta conclusão foi possível através do cálculo de sua massa, e foi identificada como uma espermedesina por meio de sua sequência N-terminal. Onde os 25 primeiros aminoácidos do seu N-terminal foram identificados, indicando uma sequência idêntica para a espermedesina AQN-1, purificada do plasma seminal de suíno (BERGERON et al., 2005). Além disso, como descrito para a espermedesina AQN-1, a espermedesina de ovino com 15,5 KDa mostrou atividade ligante a heparina. Isto sugere que esta proteína apresenta um papel similar na capacitação espermática ou ligação do espermatozóide no epitélio ovidutal ou a zona pelúcida.

Através de análise em SDS-PAGE da segunda fração, observou-se a presença de quatro proteínas, que representa 20% da proteína total do plasma seminal de ovino (RSP). Estas proteínas foram designadas RSP-15 KDa, RSP-16 KDa, RSP-22 KDa e RSP- 24 KDa. Somente as proteínas RSP-15 KDa e RSP-16 KDa apresentaram reação cruzada contra anticorpos da proteína BSP. Espermedesinas ovina e proteínas RSP interagem com heparina, mas somente as proteínas RSP se ligam a lipoproteínas de baixa densidade na membrana do oócito. Desta forma, a espermedesina é a maior proteína do plasma seminal de ovino enquanto as outras proteínas pertencem a família das BSP (BERGERON et al., 2005).

#### **2.2.4.5 Espermedesinas Caprinas**

O trato genital dos machos expressa diferentes classes de genes, e muitas destas proteínas estão envolvidas na remodelagem da superfície espermática, que ocorre durante trânsito espermático dentro do trato genital do macho e continua após ejaculação. Este processo de maturação fora dos testículos resulta em espermatozoides capazes de fertilizar os oócitos (TOPFER-PETERSEN et al.,). Estas proteínas chamadas

espermadésinas, pertencem a uma nova família de lectinas animais. É uma das muitas proteínas que compõem o plasma seminal (TOPFER-PETERSEN et al., 2005b). Estas proteínas apresentam um baixo peso molecular (12-16 KDa) que apresenta a habilidade de reconhecer ligantes para diversos carboidratos (SOLÍS et al., 1998), inibidores de proteinase (SANZ et al., 1992a), fosfolipídios (DOSTALOVA et al., 1995a), e glicoproteínas da zona pelúcida (SANZ et al., 1992b; TOPFER-PETERSEN, 1999). Através de ligação a ligantes específicos, estes polipeptídeos são capazes de influenciar diversas funções reprodutivas, como a capacitação espermática, estabilização do acrossoma, e fusão oócito-espermatozóide durante o processo de fertilização (TOPFER-PETERSEN et al., 1998).

Pela primeira vez, um polipeptídeo de 12, 591 KDa foi isolado, proveniente do plasma seminal de caprino, *Capra hircus* (TEIXEIRA et al., 2002), denominado BSFP (*Buck Seminal FluidPprotein*). BSFP através de sua sequência N-terminal mostrou homologia para espermadésinas suíno (AQN-1 e AWN), equino (AWN) e bovino (aSFP)(Figura 9). Além disso, BSFP também mostrou um alto grau de similaridade (50%) com a espermadésina suína AQN-1 e AWN, mas não apresentou ser capaz de se ligar a heparina (TEIXEIRA et al., 2006), uma propriedade biológica de alguns membros da família das espermadésinas.

MELO *et al* (2008) identificaram e isolaram o cDNA das espermadésinas de bode (*Capra hircus*) através de *screening* de 40 clones recombinantes de insertos de bactéria com primers específicos M13R e M13R, utilizando PCR.

Os genes da BSFP identificados e isolados, foram clonados, caracterizados e investigado sua expressão ao longo do trato genital, utilizando os cDNAs da vesícula seminal, testículos, epidídimos, glândulas bulbouretrais e ductos deferentes do caprino (MELO et al., 2008). Análise da sequência de 33 nucleotídeos recombinantes revelou três insertos denominadas Bodesina-1 (Bdh-1), Bodesina-2 (Bdh-2) e Bodesina-3 (Bdh-3). Todos os três clones apresentaram insertos variando de 606 a 608 pares de base de comprimento (MELO et al., 2008). Outra análise posterior de seis clones recombinantes revelou um inserto correspondente a uma espermadésina denominada Bodesina-4 (Bdh-4). O clone apresentou um inserto com 477 pares de base de comprimento (MELO et al., 2008).

A análise da estrutura primária de todas as quatro Bdh, mostrou uma região conservada que prediz ser um único domínio CUB, uma característica típica dos membros da família das espermedesinas (VARELA et al., 1997).

As estruturas primárias das bodesinas apresentam de 49 a 52% de similaridade para a espermedesina suína AWN (MELO et al., 2008). Entre as quatro Bdh identificadas, a sequência de aminoácidos da Bdh-2 demonstrou ser muito similar ao fragmento N-terminal da BSFP (MELO et al., 2008).

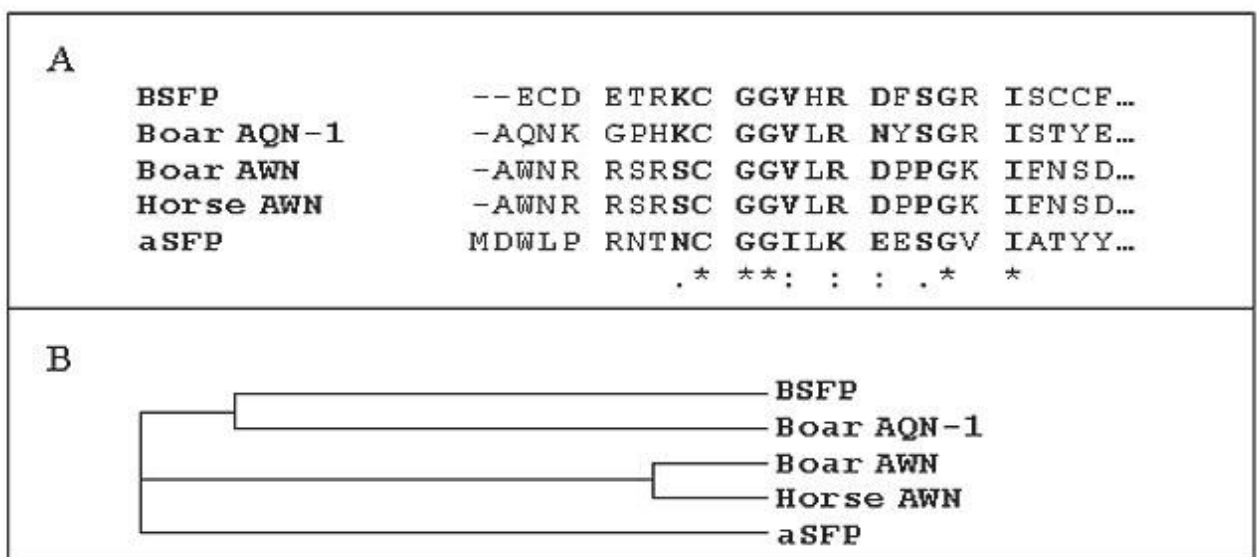


Figura 9 - Comparação da sequência de aminoácidos do N-terminal das espermedesinas de suínos (AQN-1, AWN), equino (AWN) e bovino (aSFP). Adaptado de TEIXEIRA et al., (2006).

Posteriormente, nosso grupo de pesquisa investigou o perfil de transcrição dos genes das espermadecinas caprinas ao longo do trato reprodutor masculino dos tecidos: vesícula seminal (VS), testículo (TS), glândula bulbo-uretral (BU), epidídimo (EP) e ducto deferente (DD) através de qRT-PCR em tempo real (MELO et al., 2009).

Foram detectados níveis de amplificação da bodesina em todos os tecidos examinados, exceto o tecido do ducto-deferente (figura 10). Na vesícula seminal de caprino, Bdh-2 é predominantemente expressa quando comparada às demais bodesinas. O número de transcritos que codificam Bdh-2 em vesícula seminal é da ordem de milhões de vezes maior do que Bdh-1 e milhares de vezes maior do que Bdh-3. Enquanto que o número de cópias de mRNA para Bdh-3 é aproximadamente 16 vezes superior àquele para Bdh-1. (MELO et al., 2009). Esta impressionante diferença na expressão do gene em bodesina pode refletir a função biológica que cada isoforma possui no trato genital do caprino, principalmente na vesícula seminal (MELO et al., 2009).

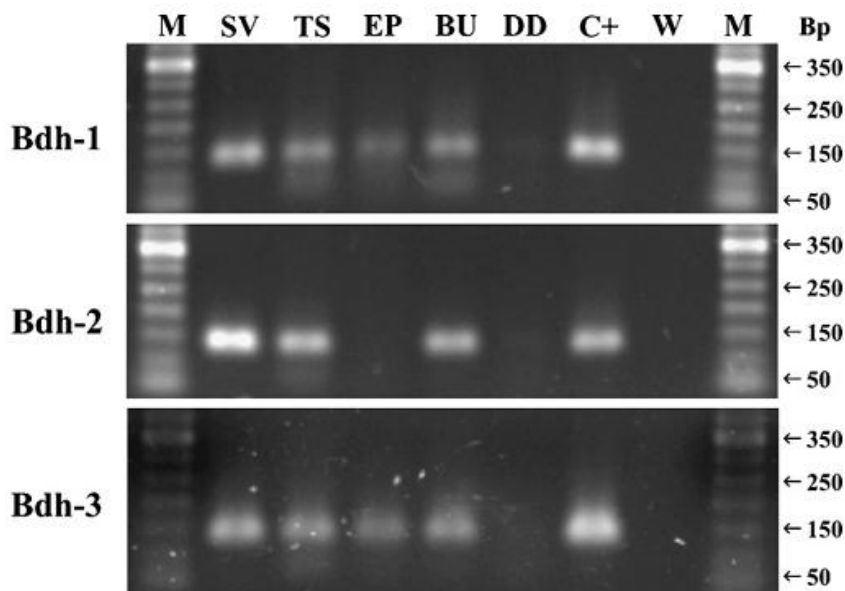


Figura 10 - Eletroforese dos produtos das amplificações das bodesinas em tecidos do trato reprodutor do bode. Adaptado de MELO et al., (2009).

### 3 JUSTIFICATIVA

O possível papel fisiológico reprodutivo das espermedesinas ainda está sendo estudada, especula-se que elas possam participar do processo de capacitação, reconhecimento e ligação entre os gametas masculinos e femininos (CALVETE et al., 1994). O heterodímero PSP-I/PSP-II contribui para a manutenção ou melhoramento da viabilidade e da motilidade dos espermatozóides (CABALLERO et al., 2005), além de apresentar atividade pró-inflamatória e imuno-estimulatória para prevenir possíveis infecções do trato reprodutor baixo e prover um ambiente uterino livre de células para os embriões gerados (ASSREUY et al., 2002; ASSREUY et al., 2003; RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 2005). A espermedesina bovina: SPADH-1 (aSFP) parece proteger o espermatozóide contra lesões oxidativas, reduzindo a peroxidação lipídica (SCHONECK et al., 1993). Já a espermedesina eqüina, HSP-7, tem a capacidade de ligar-se a carboidratos da zona pelúcida. Podendo, assim, desempenhar um importante papel como molécula de adesão primária, nas etapas iniciais do processo de fecundação (TOPFER-PETERSEN & CALVETE, 1996; TOPFER-PETERSEN et al., 2005a).

Algumas espermedesinas apresentam aplicações biotecnológicas. CABALLERO et al., (2008), adicionando o heterodímero PSP-I/PSP-II em solução contendo espermatozóide de suíno, verificou-se o aumento significativo do percentual de espermatozóides viáveis. Estes autores também verificaram que ocorre um aumento no percentual de células mortas (espermatozóides) quando estas são incubadas na ausência deste heterodímero. Demonstrando assim, que a espermedesina PSP-I/PSP-II pode ser utilizada em aplicações biotecnológicas, como a inseminação artificial, já que ela exerce um efeito decapacitante. Esta aplicação biotecnológica também foi observada por GARCIA et al., (2009), demonstrando que diferentes concentrações da espermedesina suína PSP-I/PSP-II diluída em meio com espermatozóide, melhora a motilidade e integridade da membrana, preservando a fisiologia funcional dos espermatozóide.

Na espécie caprina, o baixo volume do plasma seminal dessa espécie tornou-se um obstáculo como fonte de espermedesina para estudos na área de reprodução, bioquímica e aplicações biotecnológicas. Tornando-se necessário a produção de proteínas recombinantes.

Assim, torna-se importante a obtenção das espermedesinas recombinantes (Bdhr), viabilizando a produção em larga escala. Adicionalmente, nesse sentido, sistema bacteriano apresenta-se como uma alternativa promissora.

O sistema de expressão para proteínas recombinantes pode ser realizado em procariotos, como *Escherichia coli*. A utilização de *E. coli* como sistema de expressão proporciona inúmeras vantagens, tais como alta expressão da proteína alvo, curto período de crescimento, baixo custo e de fácil operação.

#### **4 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

As espermadesinas caprinas (Bdh-2 e Bdh-4) podem ser produzidas eficientemente em sistema bacteriano (*Escherichia coli*).

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Geral**

Produção das espermedesinas recombinantes caprinas (Bdhr) em sistema bacteriano.

### **5.2 Específicos**

- Construção dos vetores de expressão procarióticos contendo os cDNAs das espermedesinas Bdh-2 e Bdh-4.
- Produção e seleção de clones bacterianos (*E. coli* TOP 10) expressando Bdh-2r e Bdh-4r fusionadas com cauda de histidina.
- Indução da expressão e otimização das condições de produção de Bdh-2r e Bdh-4r.

## 6 CAPÍTULO I

Análise da Expressão de Proteína e Construção de um Sistema de Expressão Procariontário para o cDNA da Espermedesina de Bode (*Capra hircus*) Bdh-2

Analysis of protein expression and construction of prokaryotic expression system for buck (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA

## **Analysis of protein expression and construction of prokaryotic expression system for buck (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA**

J.B. Cajazeiras<sup>1</sup>, L.M. Melo<sup>1</sup>, E.S. Albuquerque<sup>1</sup>, G. Rádis-Baptista<sup>2</sup>, B.S. Cavada<sup>3</sup> and V.J.F. Freitas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução - LFCR, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Ciências do Mar - Labomar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas - Biomol-Lab, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

### **ABSTRACT**

The low purification efficiency and the incomplete characterization of buck spermadhesins (Bdhs) prompted us to establish an effective system to produce recombinant Bdhs (rBdhs). The Bdh-2 cDNA was inserted in a prokaryotic expression plasmid pTrcHis TOPO. The pTrcHis-Bdh-2 system was constructed to produce a His6 fusion protein in *E. coli* Top10 cells. The recombinant clones were selected by growth in ampicillin-containing medium, PCR amplifications and nucleotide sequencing. The inserted cDNA was completely identified and the recombinant protein synthesis was monitored by SDS-PAGE followed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. The expression of the insoluble rBdh-2 was achieved at 0.1 to 2.0 mM IPTG and after 2 to 6 h of induction. A greater production of rBdh-2 ( $P < 0.01$ ) occurred with 1.5 mM IPTG after 2 h of induction, and with 0.3 mM IPTG after 4 h of culture. Among the induction times investigated, 6 h showed the lowest levels of rBdh-2 production, where no difference was seen between the various concentrations of IPTG tested ( $P > 0.01$ ). The apparent molecular weight of rBdh-2 was  $15.85 \pm 0.09$  kDa, calculated by image analysis of membranes. This result agrees with the theoretical molecular weight of 15.5 kDa predicted from the nucleotide sequence. Prior to this study, expression of recombinant buck spermadhesin had never been reported. Thus, an effective prokaryotic

rBdh-2 expression system was established in order to provide a good tool for studying the biofunctions of buck spermadhesins.

Key words: *Capra hircus*; Spermadhesin; Bodhesin; Recombinant protein; cDNA; Prokaryotic expression

## INTRODUCTION

Spermadhesins are male secretory proteins that have so far been found in the seminal plasma of ungulates, being peripherally associated with the sperm surface (Reinert et al., 1996). They are a group of 12- to 16-kDa multifunctional polypeptides exhibiting a palette of ligand-binding affinities for oligosaccharides and sulfated polysaccharides such as heparin and also for serine protease inhibitor and phospholipids (reviewed in Töpfer-Petersen et al., 1998). These polypeptides are able to influence diverse reproductive functions, such as spermatozoa capacitation, acrosome stabilization, and sperm-oocyte fusion during the fertilization process (Töpfer-Petersen et al., 2008).

Spermadhesins have been characterized from boar (Calvete et al., 1995), stallion (Reinert et al., 1996), bull (Tedeschi et al., 2000), and ram (Bergeron et al., 2005) seminal plasma. In animals outside the ungulate order, neither spermadhesin proteins nor spermadhesin-specific transcripts have been detectable so far (Haase et al., 2005).

Previously, our group isolated and purified from seminal plasma and described the N-terminal sequence and molecular mass of a protein structurally characterized as the first buck spermadhesin, referred to as buck seminal fluid protein or BSFP (Teixeira et al., 2002). BSFP is approximately 12 kDa and shares 50% similarity with the swine spermadhesins AQN-1 and AWN. However, unlike the boar heparin-binding spermadhesins AQN-1, AQN-3 and AWN, BSFP is not able to bind heparin, resulting in low purification efficiency (Teixeira et al., 2006).

Only after the above proteins had been described, were some spermadhesin cDNAs cloned (Wempe et al., 1992; Kwok et al., 1993; Ekhlesi-Hundrieser et al., 2002; Melo et al., 2008). In two earlier works, we cloned and characterized four cDNAs

encoding the main isoforms of buck spermadhesins, collectively called Bodhesins or Bdhs (Melo et al., 2008; Melo et al., 2009). All deduced amino acid sequences contained the CUB domain signature of the spermadhesin family and were 49 to 52% similar to boar AWN. Among the four Bdhs amino acid sequences, Bdhs-2 was the most similar to the BSFP N-terminal fragment (Melo et al., 2008). After the investigation of the expression profile of Bdhs genes in several tissues of the buck reproductive tract (seminal vesicle, testis, epididymis, bulbourethral gland, ductus deferens and prostate) by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR), we found that the seminal vesicle is the major site of Bdhs production (Melo et al., 2009).

Further experiments are necessary to characterize the particular function of each of these buck spermadhesins in order to improve our knowledge of reproductive mechanisms in this species. On the other hand, significant amounts of protein, depending on the protein size and experimental technique used, produced in a short time with reasonable cost efficiency, are required for various biology projects (Goulding and Perry, 2003).

The low purification efficiency and the incomplete characterization of Bdhs, as well as the potential multiplicity of biotechnological applications of proteins from the spermadhesin family, prompted us to establish an effective expression system to produce recombinant Bdhs. *Escherichia coli* (*E. coli*) is the preferred host for recombinant protein expression for various studies because it is rather easy to genetically manipulate, it is relatively inexpensive to culture, and expression is fast, typically producing protein in a single day (Peti and Page, 2007). Thus, in the present study, an effective prokaryotic recombinant Bdhs-2 (rBdhs-2) expression system was established in order to provide a solid basis for future functional studies and biotechnological applications of rBdhs.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cloning of Bdh-2 cDNA**

cDNA coding for spermadhesin Bdh-2 was produced according to the method described by Melo et al. (2008). Briefly, total RNA was isolated from a single sexually mature buck of undefined breed using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Poly(A<sup>+</sup>)-RNA was obtained from total RNA by affinity chromatography on oligo(dT) cellulose, using an mRNA purification kit (Invitrogen). First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription coupled to PCR using a 3'-adaptor-Oligo(dT)18 (Clontech, Mountain View, CA, USA) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) purchased from Promega (Madison, WI, USA). Following cDNA synthesis, the 3'-rapid amplification of cDNA end (3'-RACE) was performed. Cloning of the spermadhesin gene was performed with the pGEM-T Easy Vector System and *E. coli* JM109 (Promega). The identity of Bdh-2 cDNA was assessed by nucleotide sequencing performed on Mega BACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The assembled cDNA sequence of Bdh-2 clones spanned 607 bp (GenBank accession number EF157969).

### **Construction of prokaryotic expression vector**

The coding region of Bdh-2 was amplified by PCR using as template the pGEM-T Easy cloning vector containing the cDNA obtained previously. Plasmid extraction and purification was carried out following the manufacturer's instructions of the GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare). Purified plasmids were spectrophotometrically quantified. The forward primer included the first N-terminal residues and the reverse primer included the last C-terminal residues of the mature protein and two stop codons. The primers were:

5'-TGTGGGGGSGTCCACAGA-3' (forward) and 5'-AAGATTGCTTACTCCTGA-3' (reverse). PCR amplification was performed in 20- $\mu$ L reaction volumes containing

1 U of Pfu DNA polymerase (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA), 50 ng of purified plasmid, 4 mM dNTPs and 4  $\mu$ M of each primer in the PCR-buffer provided. The PCR amplification protocol included 30 cycles of denaturation (95°C for 50 s), annealing (55°C for 50 s), and extension (72°C for 50 s) followed by a final extension for 8 min at 72°C. The products were separated on a 1% agarose gel, stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide, and visualized with a UV transilluminator. The amplified fragments were subcloned using pTrcHis TOPO TA expression kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 3  $\mu$ L of PCR product was linked to 10 ng of pTrcHis TOPO in a final reaction volume of 5  $\mu$ L. The recombinant plasmid produced was utilized for transformation of Top10 One Shot in a proportion of 1:25 (v:v). The cells were grown in a nonselective medium and plated on ampicillin-containing medium.

### **PCR colony and nucleotide sequencing**

Positive clones, selected by growing the transformed cells in LB medium containing 50  $\mu$ g/mL ampicillin, were confirmed by PCR and nucleotide sequencing using the insert-flanking pTrcHis Forward and pTrcHis Reverse primers purchased from Invitrogen. PCR was carried out using a Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany), and amplicons were separated on a 1% agarose gel, stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide, and visualized with a UV transilluminator. Plasmid extraction and purification was carried out following the manufacturer's instructions for the GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare). Nucleotide sequencing was performed using Dye terminator chemistry (DYEnamic ET Dye Terminator kit) on Mega BACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare). Each clone was sequenced twice with both sense and antisense insert-flanking primers and a consensus sequence was obtained.

### **Recombinant spermadhesin expression analysis**

One positive *E. coli* Top10 selected clone, shown by PCR amplification and nucleotide sequence to contain the correct Bdh-2 construct, was grown overnight at 37°C in LB medium containing 50 µg/mL ampicillin, followed by a 1:50 (v/v) dilution in the same medium. Cells were grown to an optical density of 0.6 at 600 nm and were induced to express rBdh-2 by the addition of isopropyl-D-thiogalactoside, IPTG (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), to final concentrations ranging from 0.1 to 2 mM. For immunoblotting analysis of successful rBdh-2 production, cells from 1-mL aliquots of the cultures were harvested after 2, 4 and 6 h of IPTG induction by centrifugation at 6000×g for 10 min and the pellets stored frozen at -20°C.

### **Immunoblotting**

For immunoblotting detection of the rBdh-2 linked to six histidine residues (rBdh-2-His6), pellet samples were submitted to SDS-PAGE method according to Laemmli (1970). Cells in loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerin) were boiled for 5 min and separated on 12.5% polyacrylamide gels. High range prestained protein ladders 14-220 kDa (GE Healthcare) were used as molecular weight markers. SDS-PAGE-separated proteins were then transferred to polyvinylidene membranes (GE Healthcare) at a constant voltage of 25 V at room temperature for 2 h using a miniVE Blot Module apparatus (GE Healthcare) and 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine and 20% methanol (v/v) as transfer buffer. Nonspecific binding sites were blocked by incubating the membranes with 5% nonfat dry milk (w/v) in TTBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20) overnight at 4°C. Subsequently, the membranes were incubated with a 1:1,500 (v/v) dilution of the monoclonal anti-polyhistidine antibody clone HIS-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 150 min at room temperature. After washing three times with TTBS, the membranes were incubated for 60 min with a 1:10,000 (v/v) dilution of anti-mouse IgG-alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich), washed three times with TTBS and once with TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl). The rBdh-2-His6 was visualized by the addition of Sigma Fast NBT/BCIP buffered substrate (Sigma-Aldrich) and the reaction was stopped with water.

### **Extraction of spermadhesin His6 fusion protein**

In order to search for the putative insoluble form of rBdh-2-His6, the cells obtained from 50 mL of culture were harvested by centrifugation at 6000×g for 10 min. The pellet was suspended in 8 mL of native buffer (50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 8.0) or in 8 mL denaturing buffer (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.8). Cells were lysed by sonication (5 cycles of 15 s sonication followed by 5 s rest) in an ice bath to reduce viscosity. The lysates were centrifuged at 6000 ×g for 30 min at 4°C. The clear supernatant (soluble fraction) and the remaining pellet (insoluble fraction) containing inclusion bodies were collected and analyzed by the immunoblotting method as described above.

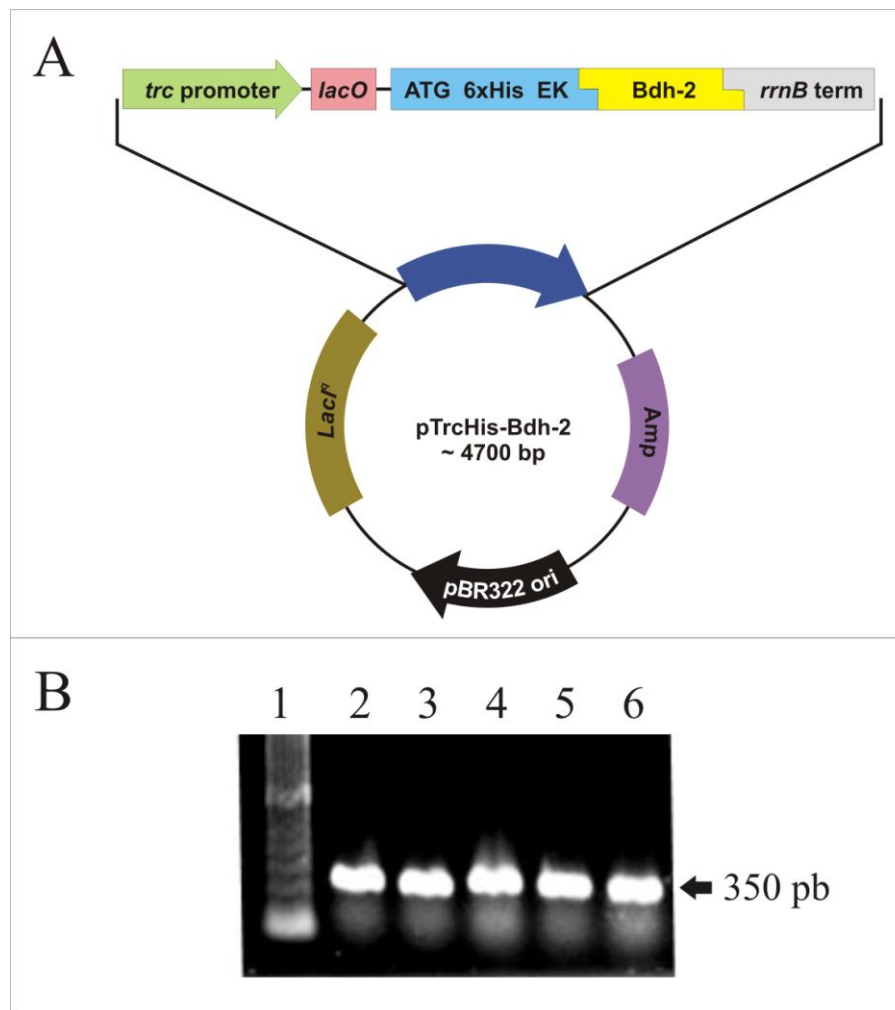
### **Image analysis and statistics**

The image of each immunoblot membrane was recorded and the intensity of each band was assessed by densitometry using an image analysis program (ImageQuant TL 2005, Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Quantitative analysis of the expression of rBdh-2 was performed by normalizing the data to the density of the band produced in the presence of 2 mM IPTG, after 2 h induction, which was assigned a value of 1.0. The quadratic curve model was utilized to calculate the apparent molecular weight of the protein. The data were expressed as means ± SEM of at least three replicates for each assay on different membranes. The program used for statistical analysis was GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were compared using Tukey's significant difference procedure and statistical significance was considered at  $P < 0.01$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

In earlier works, our group cloned and characterized cDNAs encoding the four main isoforms of buck spermadhesins, designated Bodhesin-1, -2, -3 and -4 (Melo et al., 2008; Melo et al., 2009). In the present work, we subcloned the cDNA of Bdh-2 which was the most similar to BSFP, previously purified from seminal plasma by Teiteira et al. (2002). We used as PCR template the clones produced by Melo et al. (2008) which contain cDNA inserts of 607 bp. In particular, the Bdh-2 cloned fragments comprised a 318-bp ORF (open reading frame) including the stop codon and a 278-bp 3'-untranslated region.

In order to subclone the Bdh-2 coding region corresponding to 105 amino acids into the pTrcHis TOPO vector, we used two primers designed to amplify only the ORF. The recombinant plasmid pTrcHis-Bdh-2 (Figure 1A) was transformed into *E. coli* and 19 clones were selected by growth in ampicillin-containing medium. The clones containing the construct were identified by PCR, using insert-flanking primers and then confirmed by nucleotide sequencing. The length of all PCR products was approximately 350 bp (Figure 1B). All the clones investigated contained DNA inserts compatible with the size of the ORF of the spermadhesin Bdh-2 utilized in the present study.



**Figure 1.** Construction and identification of pTrcHis-Bdh-2 prokaryotic expression vector. (A) Schematic diagram of the features of pTrcHis-Bdh-2 vector. pBR322 ori, origin of replication; Amp, ampicillin resistance gene; LacIq, lac repressor gene; lacO, lac operator; ATG, start codon; 6×His, sequence codifying for polyhistidine tag; EK, enterokinase cleavage site; Bdh-2, Bdh-2 cDNA fragment; rrnB term, transcription termination sequence. (B) Identification of recombinant plasmid pTrcHis-Bdh-2 by PCR analysis. Lane 1, High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare); lane 2 to 6, PCR amplification products of pTrcHis-Bdh-2 using insert-flanking primers.

Based on nucleotide sequencing of the expression vectors produced, one clone was selected for expression of the recombinant protein. The cDNA and the plasmid insert-flanking regions were completely identified (Figure 2). The inserted fragment showed 100% similarity with the corresponding region of Bdh-2 cDNA previously

described (GenBank accession number EF157969). Additionally, the inserted cDNA was in frame with the start codon ATG of the pTrcHis-TOPO vector. This fact ensures a correct translation and the production of a true Bdh-2 amino acid sequence. The pTrcHis-Bdh-2 vector produced encodes a polypeptide chain of 140 amino acids, of which 105 residues correspond to rBdh-2. The 35 extra amino acid residues are coded by the plasmid and correspond to N-terminal end containing six histidines (6xHis) and a cleavage site for the action of the enzyme enterokinase (Figure 2).

```

tatcgattaaataaggaggaataaaccatggggggttctcatcatcatcatcatcatggt 60
      M G G S H H H H H H G
atggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataag 120
      M A S M T G G Q Q M G R D L Y D D D D K
gatccaaccctttgtgggggggtccacagagacttctctgggaggatctccagcagtttc 180
      D P T L C G G V H R D F S G R I S S S F
tcatgggggccaagtgtacctggaccatcctcttgaagagcgggttatacagttgtactg 240
      S W G P K C T W T I L L K S G Y T V V L
acgattccatttctcagcctcaactgtaatgaagaggatgtggaaatcatagacgggctg 300
      T I P F L S L N C N E E D V E I I D G L
ccagacagtactacatttgggaggttctgttcagggggaccctgggtgtttaaactcttct 360
      P D S T T F G R F C S G G P L V F K S S
tccaatgtcatgaccgtgaaatactacaggagttccaaccagccagtatctccttttgat 420
      S N V M T V K Y Y R S S N Q P V S P F D
atattttactacgagcgtccatcagcttagtgaaagggcgaattcaattcgaagcttggc 480
      I F Y Y E R P S A - -
tgttttggcggatgagagaagattttcagcctgata 516

```

Figure 2. Nucleotide sequence of pTrcHis-Bdh-2 expression vector and translated amino acid sequence. The plasmid vector is shown by underlined letters. The start (ATG) and the two consecutive stop codons are enclosed in grey boxes. Ribosome binding site is presented in italic letters. The 6xHis tag and the enterokinase recognition sequence are shown in bold letters.

A number of central elements are essential in the design of recombinant expression systems (Baneyx, 1999; Jonasson et al., 2002). Recombinant expression plasmids require, among others, a strong transcriptional promoter to control high-level gene expression and a suitable repressor to minimize basal transcription in the absence of inducer. The most common inducer is the sugar molecule IPTG (Hannig and Makrides, 1998). The pTrcHis-TOPO vector is a pBR322-based plasmid containing the trc promoter, the lac operator (lacO) and the lacIq gene (Figure 1A). The lac operator is the binding site of lac repressor, which is encoded by the lacIq gene, to provide regulated expression of the trc promoter (Jacob and Monod, 1961; Müller-Hill et al., 1968). Thus, in the absence of IPTG, lac repressor binds to the lacO sequence, repressing transcription (Jacob and Monod, 1961; Müller-Hill et al., 1968). To induce expression, IPTG is added to a final concentration of interest and the culture monitored for expression of the recombinant protein. In the present work, the expression of the spermadhesin His6 fusion protein was achieved at IPTG concentrations ranging from 0.1 to 2.0 mM and after 2 to 6 h of induction (Figure 3). The recombinant protein synthesis was monitored by SDS-PAGE under reducing conditions followed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody.

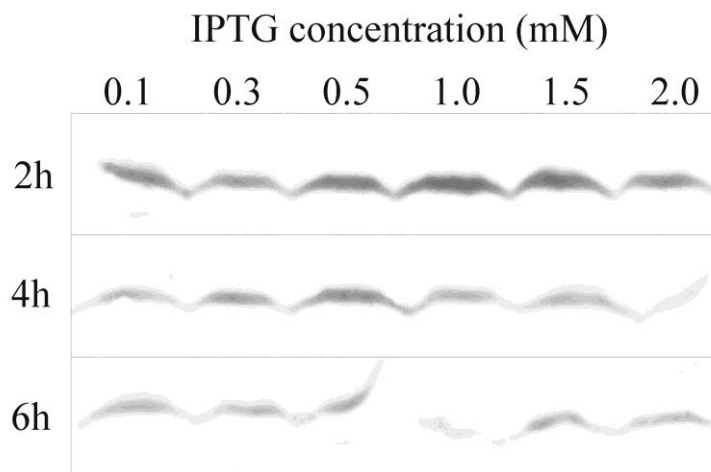


Figure 3. Expression analysis of His6-fusion rBdh-2 spermadhesin in *E. coli*. Total proteins of pTrcHis-Bdh-2 transformant were submitted to 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. Cell samples were collected after 2, 4 or 6 h of IPTG induction at a final concentration ranging from 0.1 to 2.0 mM.

His6-Bdh-2 expression was induced at 37°C, and the apparent molecular weight was  $15.85 \pm 0.09$  kDa ( $n = 36$ ), calculated by image analysis of membranes. This result agrees with the theoretical molecular weight of 15.5 kDa predicted from the pTrcHis-Bdh-2 nucleotide sequence that encodes rBdh-2 with about 12 kDa and the artificial histidine tag with 3 to 4 kDa. Additionally, the rBdh-2 molecular weight is in accordance with that described for all spermadhesin members, ranging from 12 to 16 kDa (Töpfer-Petersen et al; 1998). We also compared the relative protein productions by densitometric analysis of the intensity of each band on membrane images (Figure 4). A significantly greater production of rBdh-2 ( $P < 0.01$ ) occurred in the presence of 1.5 mM IPTG after 2 h of induction, and with 0.3 mM IPTG after 4 h of culture. Among the induction times investigated, 6 h showed the lowest levels of rBdh-2 production, where no difference was seen between the various concentrations of IPTG tested ( $P > 0.01$ ).

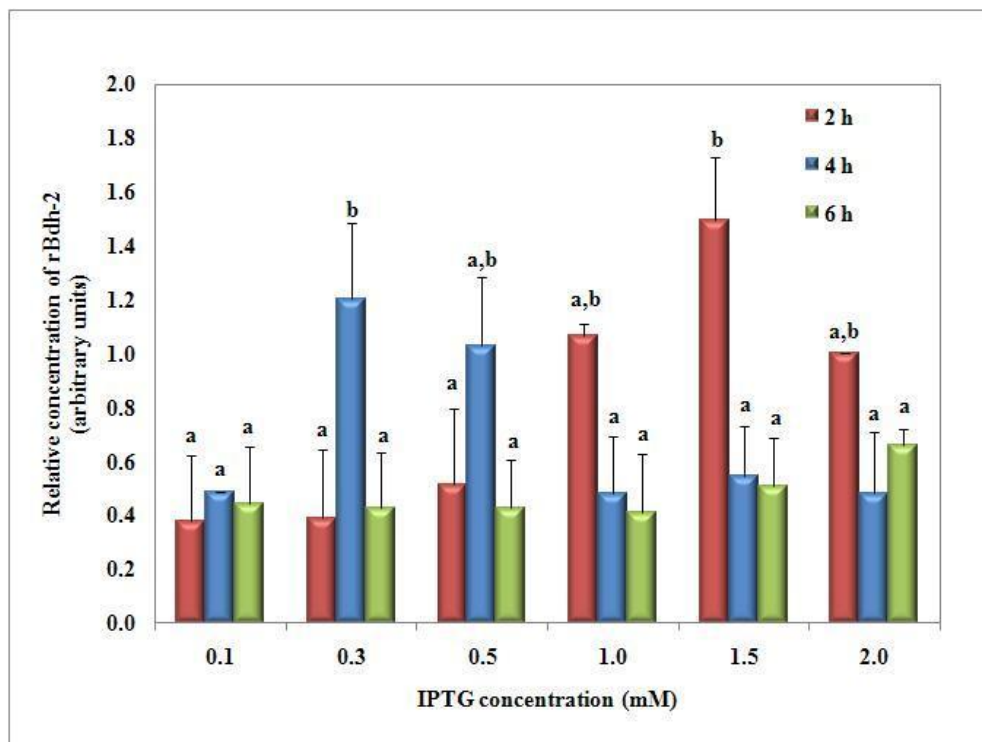


Figure 4. Effects of IPTG concentration and time of induction on relative abundance of His6-fusion rBdh-2 spermadhesin in *E. Coli* expression system. Bacterial samples were collected after 2 h (red bars), 4 h (blue bars) or 6 h (green bars) of IPTG induction at a final concentration ranging from 0.1 to 2.0 mM. Bars with different superscripts differ significantly ( $P < 0.01$ ).

*E. coli* is the preferred host for heterologous protein production for several studies. However, some proteins simply fail to be expressed in *E. coli*, or are expressed but in an insoluble form as inclusion bodies (Peti and Page, 2007). Inclusion bodies are a set of structurally complex aggregates often believed to occur as a stress response when recombinant protein is expressed at high rates (Van den Berg et al., 1999). The insoluble recombinant protein normally enriches the inclusion bodies by 50–95% of the protein material (Carbonell and Villaverde, 2002). Rather little is known about the mechanism of inclusion body formation (Villaverde and Carrio, 2003). However, it is known that the formation of inclusion bodies in recombinant expression systems is the result of an imbalance between in vivo protein aggregation and solubilization (Jonasson et al., 2002).

In the present study, to examine the distribution of expressed rBdh-2 protein in soluble and insoluble fractions, both the supernatant and pellet of cell lysates after sonication in native buffer were analyzed (Figure 5A). Samples were also analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and subsequent immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. A single band corresponding to His6-Bdh-2 was produced after IPTG induction (Figure 5A, lanes 1 and 2) and was almost insoluble in native buffer (Figure 5A, lanes 3 and 4). Thus, the synthesized rBdh-2 fusion protein was obtained largely in the insoluble fraction of the bacterial extract, as inclusion bodies. However, after cell sonication in denaturing buffer, approximately half of the total amount of rBdh-2 was dissolved (Figure 5B, lanes 3 and 4).

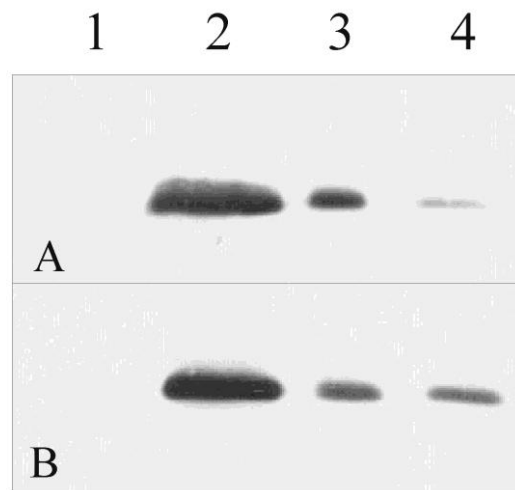


Figure 5. Extraction of His6-fusion rBdh-2 produced in *E. coli* with native (A) or denaturing (B) buffer. Total proteins of pTrcHis-Bdh-2 transformant were submitted to 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. Samples of bacterial culture before (lane 1) and after (lane 2) IPTG induction, as well as the insoluble (lane 3) and soluble (lane 4) fractions were used.

The prokaryotic expression system constructed in the present work allowed the efficient production of the spermadhesin Bdh-2 in the insoluble form in *E. coli*. In addition, the maximal production of rBdh-2 is probably obtained after 2 to 4 h of induction with IPTG. Thus, we believe that the longest induction period, that is 6 h, led to the degradation of the protein expressed. This is possible because inclusion bodies are not inert aggregates but act as a transient reservoir for loosely packaged folding intermediates *in vivo* (Carrio and Villaverde, 2001). Proteases are directly involved in the *in situ* degradation of unfolded or misfolded inclusion body-associated polypeptides by interaction with exposed hydrophobic patches (Carbonell and Villaverde, 2002). Arrest of recombinant protein synthesis results in the efficient removal and refolding of inclusion bodies but with most protein degraded by proteases and only small fractions resisting further processing (Carrio and Villaverde, 2001).

As shown in the present assay, the inclusion body aggregates can be solubilized using detergents such as urea. Subsequently, native protein can be prepared by in vitro refolding from solubilized inclusion bodies either by dilution, dialysis or on-column refolding methods (Middelberg, 2002; Sørensen et al., 2003).

Recently, recombinant boar AQN-1 and bull aSFP spermadhesins were successfully produced in a prokaryotic system (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2008). The cited authors demonstrated that recombinant wild-type and some mutant spermadhesins exhibited similar mannose-binding characteristics, when compared to seminal plasma-isolated ones. Similar to that work, our expression system was constructed to produce an insoluble spermadhesin His6 fusion protein in *E. coli* Top10 cells. Thus, we propose that, after solubilization, rBdh-2 keeps the same putative biological activity as the seminal plasma-isolated BSFP.

Prior to this study, expression of recombinant buck spermadhesin had never been reported. After affinity purification, the production of anti-rBdh-2 antibodies is more feasible. These antibodies will serve as a tool to access the expression level and the function of native Bdh-2 from buck seminal plasma. Additionally, the direct application of rBdhs has great potential with regard to enhancing our knowledge of buck reproductive mechanisms and further application in reproductive biotechnologies.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the following funding agencies: CNPq (Brasília, Brazil) FUNCAP (Fortaleza, Brazil) and International Foundation for Science (Stockholm, Sweden), the last through a project coordinated by Dr. D.I.A. Teixeira. J.B. Cajazeiras received a fellowship from CNPq, Dr. L.M. Melo is a fellow of the CAPES/PNPD (Brasília, Brazil) program and Drs. G. Rádis-Baptista, B.S. Cavada and V.J.F. Freitas are CNPq Research Scholars. Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

## REFERENCES

- Baneyx F (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 411-421.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C and Manjunath P (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 71: 461-470.
- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Raida M, et al. (1995). Boar spermadhesin PSP-II: Location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS Lett.* 365: 179-182.
- Carbonell X and Villaverde A (2002). Protein aggregated into bacterial inclusion bodies does not result in protection from proteolytic digestion. *Biotechnol. Lett.* 24: 1939-1944.
- Carrío MM and Villaverde A (2001). Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett.* 489: 29-33.
- Ekhlas-Hundrieser M, Sinowatz F, Greiser de Wilke I, Waberski D, et al. (2002). Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 32-41.
- Ekhlas-Hundrieser M, Calvete JJ, Von Rad B, Hettel C, et al. (2008). Point mutations abolishing the mannose-binding capability of boar spermadhesin AQN-1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784: 856-862.
- Goulding CW and Perry LJ (2003). Protein production in *Escherichia coli* for structural studies by X-ray crystallography. *J. Struct. Biol.* 142: 133-143.
- Haase B, Schlötterer C, Hundrieser ME, Kuiper H, et al. (2005). Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* 352: 20-29.

Hannig G and Makrides SC (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 16: 54-60.

Jacob F and Monod J (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356.

Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA and Stahl S (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35: 91-105.

Kwok SC, Yang D, Dai G, Soares MJ, et al. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I, and PSP-II: new members of the spermadhesin family. *DNA Cell Biol.* 12: 605-610.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Melo LM, Teixeira DIA, Havt A, Cunha RM, et al. (2008). Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 8-16.

Melo LM, Nascimento AS, Silveira FG, Cunha RM, et al. (2009). Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). *Anim. Reprod. Sci.* 110: 245-255.

Middelberg A (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 20: 437.

Müller-Hill B, Crapo L and Gilbert W (1968). Mutants that make more lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59: 1259-1264.

Peti W and Page R (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Prot. Exp. Purif.* 51: 1-10.

Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, et al. (1996). Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur. J. Biochem.* 242: 636-640.

Sørensen HP, Sperling-Petersen HU and Mortensen KK (2003). Dialysis strategies for protein refolding. Preparative streptavidin production. *Protein Expr. Purif.* 32: 252-259.

- Tedeschi G, Oungre E, Mortarino M, Negri A, et al. (2000). Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem.* 267: 6175-6179.
- Teixeira DIA, Cavada BS, Sampaio AH, Havt A, et al. (2002). Isolation and partial characterisation of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. *Prot. Pep. Lett.* 9: 331-335.
- Teixeira DIA, Melo LM, Gadelha CAA, Cunha RMS, et al. (2006). Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gen. Mol. Res.* 5: 79-87.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, et al. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30: 217-224.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M and Tsoleva M (2008). Glycobiology of fertilization in the pig. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 717-736.
- Van den Berg B, Ellis RJ and Dobson CM (1999). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* 18: 6927-6933.
- Villaverde A and Carrio MM (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* 25: 1385-1395.
- Wempe F, Einspanier R and Scheit KH (1992). Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 232-237.

## 7 CAPÍTULO II

Expressão da Espermalesina recombinante de Bode (*Capra hircus*) em um sistema procariótico

Expression of recombinant buck (*Capra hircus*) spermadhesin in a prokaryotic system

Jornal of Veterinary Science: submetido para publicação em agosto de 2009

**Expression of recombinant buck (*Capra hircus*) spermadhesin in a prokaryotic system**

**João B. Cajazeiras<sup>1</sup>, Luciana M. Melo<sup>1</sup>, Érica S. Albuquerque<sup>1</sup>, Antonia S.F. Nascimento<sup>2</sup>, Gandhi Rádis-Baptista<sup>3</sup>, Benildo S. Cavada<sup>2</sup>, Vicente J.F. Freitas<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), State University of Ceará, Faculty of Veterinary, Av. Dedé Brasil, 1700, Fortaleza-CE, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Av. Humberto Monte s/n, bloco 907, sala 1075, Campus do Pici, Fortaleza-CE, Brazil

<sup>3</sup> Instituto de Ciências do Mar (Labomar), Federal University of Ceará, Av. Abolição, 3207, Fortaleza-CE, Brazil

\*Corresponding author:

Vicente José de F. Freitas

Universidade Estadual do Ceará - Faculdade de Veterinária

Av. Dedé Brasil, 1700, Fortaleza-CE, 60740-903, BRAZIL

Tel: + 55-85-31019861      Fax: +55-85-31019840      E-mail: vjff@pq.cnpq.br

Running title: Expression of recombinant spermadhesin in prokaryotic system

## ABSTRACT

The low purification efficiency and the incomplete characterization of buck spermadhesins (Bdhs) prompted us to establish an effective system to produce recombinant Bdhs (rBdhs). The Bdh-4 cDNA was inserted in a prokaryotic expression plasmid pTrcHis TOPO. The pTrcHis-Bdh-4 system was constructed to produce a His<sub>6</sub> fusion protein in *E. coli* Top10 cells. The recombinant clones were selected by growth in ampicillin-containing medium, PCR amplifications and nucleotide sequencing. The inserted cDNA was completely identified and the recombinant protein synthesis was monitored by SDS-PAGE followed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. The expression of the insoluble rBdh-4 was achieved at 0.1 to 2.0 mM IPTG and after 2 to 6 h of induction. A greater production of rBdh-4 ( $P < 0.001$ ) was obtained with 0.1 mM IPTG after 2 h of induction. The apparent molecular weight of rBdh-4 was  $18.17 \pm 0.03$  kDa, calculated by image analysis of membranes. This result agrees with the theoretical molecular weight of 16.5 kDa predicted from the nucleotide sequence. In conclusion, an effective prokaryotic rBdh-4 expression system was established in order to provide a good tool for studying the biofunctions of buck spermadhesins.

**Keywords:** *Capra hircus*, semen, spermadhesin, recombinant protein, cDNA

## INTRODUCTION

The seminal plasma, the fluid in which mammalian spermatozoa are suspended in semen, is a complex mixture of secretions originating from the epididymis and accessory glands [15]. The proteins of seminal plasma have important effects on sperm function, influencing the fertilizing ability of spermatozoa, and exert effects on female reproductive physiology [17].

An important group of seminal plasma proteins belongs to a group of lectin-like proteins called spermadhesins. Spermadhesins are a group of polypeptides of 12-16 kDa found in seminal plasma and peripherally associated with the sperm surface [16], which are able to interact with some sugar-containing receptors on cell surfaces.

Spermadhesins have already been described in boar, stallion, bull, ram, and buck. Boar has five spermadhesins designated AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I, and PSPII [3,20]. Another spermadhesin was described in horse (HSP-7), which attaches to the sperm surface at the time of ejaculation [11]. Studies in bull have demonstrated the presence of the spermadhesin aSFP which seems to be a growth factor with effects on ovarian cells [21]. In sheep, it was purified a 15.5 kDa protein from ram seminal plasma (RSP) that was identified as a spermadhesin by N-terminal sequencing [2].

Previously, our group isolated and purified from seminal plasma and described the N-terminal sequence and molecular mass of a protein structurally characterized as the first buck spermadhesin, referred to as buck seminal fluid protein or BSFP [13]. However, unlike the boar heparin-binding spermadhesins, BSFP is not able to bind heparin, resulting in low purification efficiency [14]. In two earlier works, we cloned and characterized four cDNAs encoding the main isoforms of buck spermadhesins, collectively called Bodhesins or Bdhs [9,10].

The low purification efficiency and the incomplete characterization of Bdhs, as well as the potential multiplicity of biotechnological applications of proteins from the spermadhesin family, prompted us to establish an effective expression system to produce recombinant Bdhs. Currently, our laboratory is more deeply studying each one of these buck spermadhesins. Thus, the aim of the present study was to demonstrate an

effective prokaryotic recombinant Bdh-4 (rBdh-4) expression system in order to provide a solid basis for further studies with rBdhs.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cloning of Bdh-4 cDNA**

cDNA coding for spermadhesin Bdh-4 was produced according to the method described [9]. Briefly, total RNA was isolated from a single sexually mature buck of undefined breed using the Trizol reagent (Invitrogen, USA), following the manufacturer's instructions. Poly(A<sup>+</sup>)-RNA was obtained from total RNA by affinity chromatography on oligo(dT) cellulose, using a mRNA purification kit (Invitrogen, USA). First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription coupled to PCR using a 3'-adaptor-Oligo(dT)18 (Clontech, USA) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) purchased from Promega (Madison, USA). Following cDNA synthesis, the 5'-rapid amplification of cDNA end (5'-RACE) was performed. Cloning of the spermadhesin gene was performed with the pGEM-T Easy Vector System and *E. coli* JM109 (Promega, USA). The identity of Bdh-4 cDNA was assessed by nucleotide sequencing performed on Mega BACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare, USA). The assembled cDNA sequence of Bdh-4 clones spanned 477 bp (GenBank accession number EF157969).

### **5'-end amplification of spermadhesin cDNAs**

For 5'-RACE, a specific antisense primer called SMD-AS (5'-TCACTAAGCTKYTGGACGC-3'), specific for the 3'-end coding region of buck spermadhesin cDNA, was synthesized, and 5 µg of seminal vesicle mRNA were used. The synthesis and amplification of spermadhesin cDNA end was performed by the 5'-RACE System for RACEs, Version 2.0, according to the manufacturer's protocols (Invitrogen, USA). PCR was conducted using the same specific antisense primer

described above (SMD-AS) and an anchor primer supplied with the kit. The products were analyzed on a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Cloning and sequence analysis of spermadhesin 5'-end cDNA followed the same protocols as described above.

### **Construction of prokaryotic expression vector**

The coding region of Bdh-4 was amplified by PCR using as template the pGEM-T Easy cloning vector containing the cDNA obtained previously. Plasmid extraction and purification was carried out following the manufacturer's instructions of the GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, USA). Purified plasmids were spectrophotometrically quantified. The forward primer included the first N-terminal residues and the reverse primer included the last C-terminal residues of the mature protein and two stop codons. The primers were:

5'-TCAGGAGTAAGCAATCTTCCT-3' (forward) and 5'-TCACTAAGCTKYTGGACGC-3' (reverse). PCR amplification was performed in 20- $\mu$ L reaction volumes containing 1 U of Pfu DNA polymerase (Stratagene, USA), 50 ng of purified plasmid, 4 mM dNTPs and 4  $\mu$ M of each primer in the PCR-buffer provided. The PCR amplification protocol included 30 cycles of denaturation (95°C for 50 s), annealing (55°C for 50 s), and extension (72°C for 50 s) followed by a final extension for 8 min at 72°C. The products were separated on a 1% agarose gel, stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide, and visualized with a UV transilluminator. The amplified fragments were subcloned using pTrcHis TOPO TA expression kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 3  $\mu$ L of PCR product was linked to 10 ng of pTrcHis TOPO in a final reaction volume of 5  $\mu$ L. The recombinant plasmid produced was utilized for transformation of Top10 One Shot in a proportion of 1:25 (v:v). The cells were grown in a nonselective medium and plated on ampicillin-containing medium.

### **PCR colony**

Positive clones, selected by growing the transformed cells in LB medium containing 50 µg/mL ampicillin, were confirmed by PCR using the insert-flanking pTrcHis Forward and pTrcHis Reverse primers (Invitrogen, USA). PCR was carried out using a Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Germany), and amplicons were separated on a 1% agarose gel, stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide, and visualized with a UV transilluminator.

### **Recombinant spermadhesin expression analysis**

One positive *E. coli* Top10 selected clone, shown by PCR amplification and nucleotide sequence to contain the correct Bdh-4 construct, was grown overnight at 37°C in LB medium containing 50 µg/mL ampicillin, followed by a 1:50 (v/v) dilution in the same medium. Cells were grown to an optical density of 0.6 at 600 nm and were induced to express rBdh-4 by the addition of isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG (USB Corporation, USA), to final concentrations ranging from 0.1 to 2 mM. For immunoblotting analysis of successful rBdh-4 production, cells from 1-mL aliquots of the cultures were harvested after 2, 4 and 6 h of IPTG induction by centrifugation at 6000 ×g for 10 min and the pellets stored frozen at -20 °C.

### **SDS-polyacrylamide gel electrophoresis**

Pellet sample were submitted SDS-polyacrylamide gel electrophoresis standard method using 12.5% polyacrylamide gel. Protein extracts were boiled in loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.1 % Bromphenole Blue, 10% Glycerin) for 5 min and 18 µl were loaded in each lane. High range protein standards (GE Healthcare, USA) were used as molecular weight markers.

### **Western blot analysis**

SDS-PAGE-separated proteins were then transferred to polyvinylidene membranes (GE Healthcare, USA) at a constant voltage of 25 V at room temperature for 2 h using a miniVE Blot Module apparatus (GE Healthcare, USA) and 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine and 20% methanol (v/v) as transfer buffer. Nonspecific binding sites were blocked by incubating the membranes with 5% nonfat dry milk (w/v) in TTBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20) overnight at 4 °C. Subsequently, the membranes were incubated with a 1:1.500 (v/v) dilution of the monoclonal anti-polyhistidine antibody clone HIS-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 150 min at room temperature. After washing three times with TTBS, the membranes were incubated for 60 min with a 1:10.000 (v/v) dilution of anti-mouse IgG-alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, USA), washed three times with TTBS and once with TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl). The rBdh-4-His<sub>6</sub> was visualized by the addition of Sigma Fast NBT/BCIP buffered substrate (Sigma-Aldrich, USA) and the reaction was stopped with water.

### **Solubilization of inclusion bodies**

In order to search for the putative insoluble form of rBdh-4-His<sub>6</sub>, the cells obtained from 50 mL of culture were harvested by centrifugation at 6000 ×g for 10 min. The pellet was suspended in 8 mL of native buffer (50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 8.0) or in 8 mL denaturing buffer (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.8). Cells were lysed by sonication (5 cycles of 15 s) in an ice bath to reduce viscosity. The lysates were centrifuged at 6000 ×g for 30 min at 4°C. The clear supernatant (soluble fraction) and the remaining pellet (insoluble fraction) containing inclusion bodies were collected and analyzed by the immunoblotting method as described above.

### **Image analysis and statistics**

The image of each immunoblot membrane was recorded and the intensity of each band was assessed by densitometry using an image analysis program (ImageQuant TL 2005, Amersham Biosciences, USA). Quantitative analysis of the expression of rBdh-4 was performed by normalizing the data to the density of the band produced in the presence of 2 mM IPTG, after 2 h induction, which was assigned a value of 1.0. The quadratic curve model was utilized to calculate the apparent molecular weight of the protein. The data were expressed as means  $\pm$  SEM of at least three replicates for each assay on different membranes. The program used for statistical analysis was GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, USA). Data were compared using Tukey's significant difference procedure and statistical significance was considered at  $P < 0.001$ .

### **RESULTS**

In the present work, we subcloned the cDNA of Bdh-4. We used as PCR template the clones produced previously [9] which contain cDNA inserts of 477 bp. In particular, the Bdh-4 cloned fragments comprised a 342-bp ORF including the stop codon and a 278-bp 3'-untranslated region.

In order to subclone the Bdh-4 coding region corresponding to 113 amino acids into the pTrcHis TOPO vector, we used two primers designed to amplify only the ORF. The recombinant plasmid pTrcHis-Bdh-4 was transformed into *E. coli* and 19 clones were selected by growth in ampicillin-containing medium. The clones containing the construct were identified by PCR, using insert-flanking primers and then confirmed by nucleotide sequencing. The length of all PCR products was approximately 350 bp (Fig. 1). All the clones investigated contained DNA inserts compatible with the size of the ORF of the Bdh-4 spermadhesin utilized in the present study.

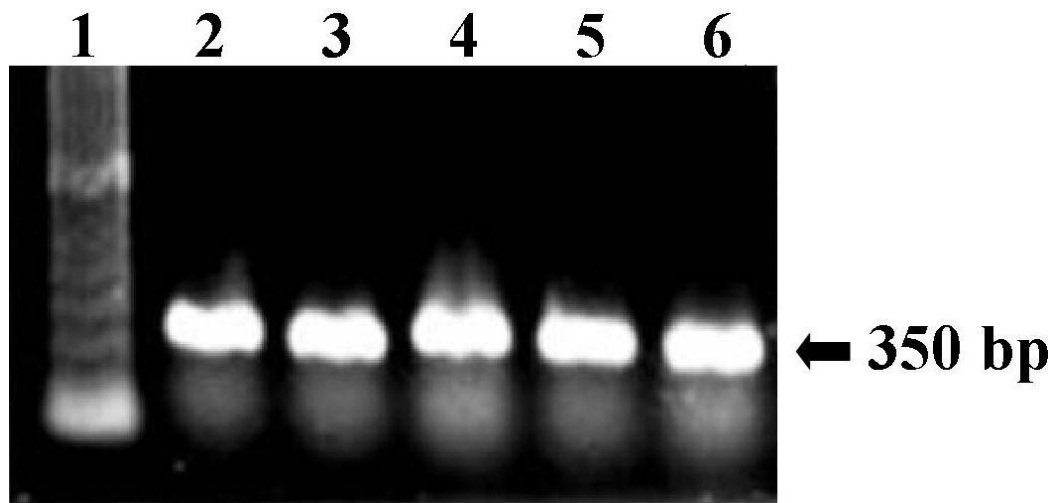


Fig. 1. Identification of recombinant plasmid pTrcHis-Bdh-4 by PCR analysis. Lane 1, High-Range Rainbow Molecular Weight Markers; lane 2 to 6, PCR amplification products of pTrcHis-Bdh-4 using insert-flanking primers.

Based on nucleotide sequencing of the expression vectors produced, one clone was selected for expression of the recombinant protein. The cDNA and the plasmid insert-flanking regions were completely identified (Fig. 2). The inserted fragment showed 100% similarity with the corresponding region of Bdh-4 cDNA previously described (GenBank accession number EF157969). Additionally, the inserted cDNA was in frame with the start codon ATG of the pTrcHis-TOPO vector. This fact ensures a correct translation and the production of a true Bdh-4 amino acid sequence. The pTrcHis-Bdh-4 vector produced encodes a polypeptide chain of 134 amino acids, of which 113 residues correspond to rBdh-4.

```

gcnnacgtgtttgtatcttgtagctgggcccgtgngncgntgctgaggctggtgccag
gctgcaagatgaagctgtccagcgtcatcccttgggccttgcctgctcagcacagccaca
      M K L S S V I P W A L L L S T A T
ctggtttcaacagaatcggatgaagacactagaaaatgtggggcgtccacagagacttc
      L V S T E S D E D T R K C G G V H R D F
tctgggaggatctccagcagtttctcatggggccaaagtgtacctggaccatcctcttg
      S G R I S S S F S W G P K C T W T I L L
aagagcggttatacagttgtactgacaattccatttctcagcctcaactgtaatgaagag
      K S G Y T V V L T I P F L S L N C N E E
gatgtggaaatcatagacgggctgccagacagtactacatttgggaggttctgttcaggg
      D V E I I D G L P D S T T F G R F C S G
ggaccctggtgtttaaacttcttccaatgtcatgaccgtgaaatactacagaagttcc
      G P L V F K S S S N V M T V K Y Y R S S
aaccagccagtatctcttttgatatatttactacgagcgtccaacagcttagtga
      N Q P V S P F D I F Y Y E R P T A stop stop

```

Fig. 2. Nucleotide sequence of pGEM T easy-Bdh-4 expression vector and translated amino acid sequence. The plasmid vector is shown by underlined letters. The two consecutive stop codons are enclosed in gray letters. Nucleotide sequence encoding the N-terminal region of Bdh-4 is shown in bold letters.

The expression of the spermadhesin His<sub>6</sub> fusion protein was achieved at IPTG concentrations ranging from 0.1 to 2.0 mM and after 2 to 6 h of induction (Fig. 3). The recombinant protein synthesis was monitored by SDS-PAGE under reducing conditions followed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody.

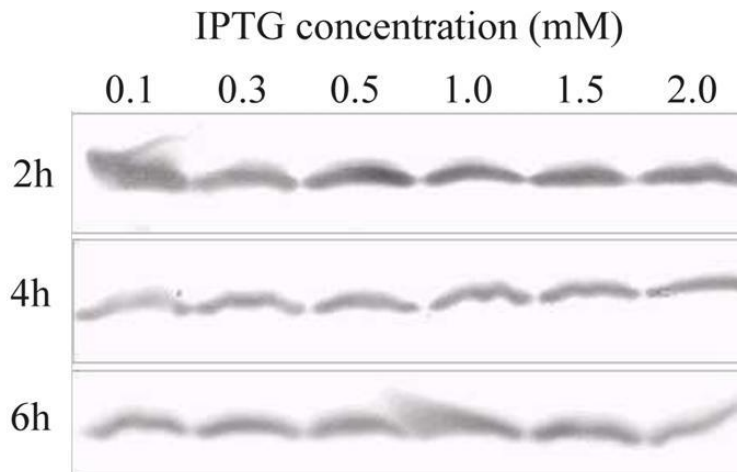


Fig. 3. Expression analysis of His<sub>6</sub>-fusion rBdh-4 spermadhesin in *E. coli*. Total proteins of pTrcHis-Bdh-4 transformant were submitted to 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. Cell samples were collected after 2, 4 or 6 h of IPTG induction at a final concentration ranging from 0.1 to 2.0 mM.

His<sub>6</sub>-Bdh-4 expression was induced at 37 °C, and the apparent molecular weight was  $18.17 \pm 0.03$  kDa (n= 35), calculated by image analysis of membranes. The relative protein productions also was compared the by densitometric analysis of the intensity of each band on membrane images (Fig. 4). A significantly greater production of rBdh-4 ( $P < 0.001$ ) occurred in the presence of 0.1 mM IPTG after 2 h of induction. Among the induction times investigated, 6 h showed the lowest levels of rBdh-4 production, where no difference was seen between the various concentrations of IPTG tested ( $P > 0.001$ ).

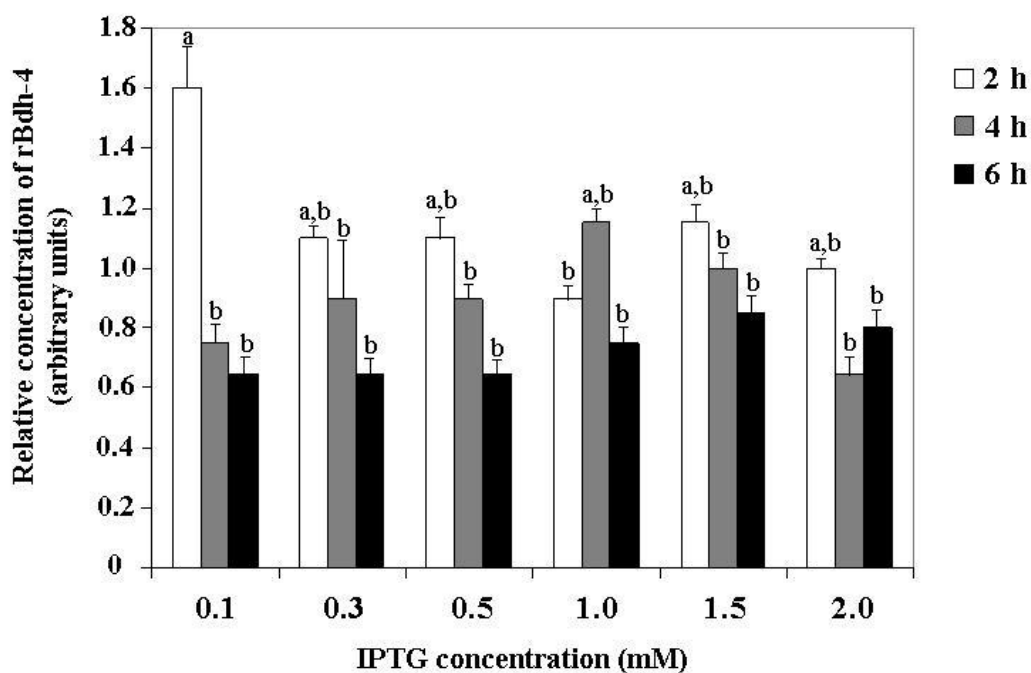


Fig. 4. Effects of IPTG concentration and time of induction on relative abundance of His<sub>6</sub>-fusion rBdh-4 spermadhesin in *E. coli* expression system. Bacterial samples were collected after 2 h (white bars), 4 h (gray bars) or 6 h (black bars) of IPTG induction at a final concentration ranging from 0.1 to 2.0 mM. Bars with different superscripts differ significantly ( $P < 0.001$ ).

In order to examine the distribution of expressed rBdh-4 protein in soluble and insoluble fractions, both the supernatant and pellet of cell lysates after sonication in native buffer were analyzed (Fig. 5A). Samples were also analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and subsequent immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. A single band corresponding to His<sub>6</sub>-Bdh-4 was produced after IPTG induction (Fig. 5A, lanes 1 and 2) and was almost insoluble in native buffer (Fig. 5A, lanes 3 and 4). Thus, the synthesized rBdh-4 fusion protein was obtained largely in the insoluble fraction of the bacterial extract, as inclusion bodies. However, after cell sonication in denaturing buffer, approximately half of the total amount of rBdh-4 was dissolved (Fig. 5B, lanes 3 and 4).

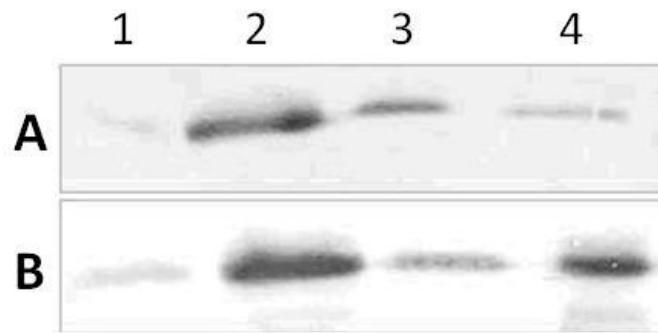


Fig. 5. Extraction of His<sub>6</sub>-fusion rBdh-2 produced in *E. coli* with native (A) or denaturing (B) buffer. Total proteins of pTrcHis-Bdh-4 transformant were submitted to 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using monoclonal anti-His antibody. Samples of bacterial culture before (lane 1) and after (lane 2) IPTG induction, as well as the insoluble (lane 3) and soluble (lane 4) fractions were used.

## DISCUSSION

A number of central elements are essential in the design of recombinant expression systems [1]. Recombinant expression plasmids require a strong transcriptional promoter to control high-level gene expression and a suitable repressor to minimize basal transcription in the absence of inducer. The most common inducer is the sugar molecule IPTG [7].

*E. coli* is the preferred host for heterologous protein production for several studies. However, some proteins simply fail to be expressed in *E. coli*, or are expressed but in an insoluble form as inclusion bodies. Inclusion bodies are a set of structurally complex aggregates often believed to occur as a stress response when recombinant protein is expressed at high rates [18]. The insoluble recombinant protein normally enriches the inclusion bodies by 50–95% of the protein material [4]. It is known that the formation of inclusion bodies in recombinant expression systems is the result of an imbalance between *in vivo* protein aggregation and solubilization [8].

His<sub>6</sub>-Bdh-4 expression was induced and the apparent molecular weight was  $18.17 \pm 0.09$  kDa. This result agrees with the theoretical molecular weight. Additionally, the rBdh-4 molecular weight is in accordance with that described for all spermadhesin members, ranging from 12 to 16 kDa [16].

The prokaryotic expression system constructed in the present work allowed the efficient production of the spermadhesin Bdh-4 in the insoluble form in *E. coli*. In addition, the maximal production of rBdh-4 is obtained after at 2h of induction with IPTG. Thus, the longest induction period (4 to 6 h) should be led to the degradation of the protein expressed. This is possible because inclusion bodies are not inert aggregates but act as a transient reservoir for loosely packaged folding intermediates *in vivo* [5]. As shown in the present assay, the inclusion body aggregates can be solubilized using detergents such as urea. Subsequently, native protein can be prepared by *in vitro* refolding from solubilized inclusion bodies either by dilution, dialysis or on-column refolding methods [12].

Recently, recombinant boar AQN-1 and bull aSFP spermadhesins were successfully produced in a prokaryotic system [6]. The cited authors demonstrated that recombinant wild-type and some mutant spermadhesins exhibited similar mannose-binding characteristics, when compared to seminal plasma-isolated ones. Similar to that work, our expression system was constructed to produce an insoluble spermadhesin His<sub>6</sub> fusion protein in *E. coli* Top10 cells. Thus, we propose that, after solubilization, rBdh-4 keeps the same putative biological activity as Bdhs.

After affinity purification, the production of anti-rBdh-4 antibodies is more feasible. These antibodies will serve as a tool to access the expression level and the function of native Bdh-4 from buck seminal plasma. Additionally, the direct application of rBdhs has great potential with regard to enhancing our knowledge of buck reproductive mechanisms and further application in reproductive biotechnologies.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the following funding agencies: CNPq (Brasília, Brazil) FUNCAP (Fortaleza, Brazil) and International Foundation for Science (Stockholm, Sweden), the last through a project coordinated by Dr. D.I.A. Teixeira. J.B. Cajazeiras received a fellowship from CNPq, Dr. L.M. Melo is a fellow of the CAPES/PNPD (Brasília, Brazil) program and Drs. G. Rádis-Baptista, B.S. Cavada and V.J.F. Freitas are CNPq Research Scholars.

## REFERENCES

1. **Baneyx F.** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999, **10**, 411-421.
2. **Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P.** Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 2005, **71**, 461-470.
3. **Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Raida M, Sanz L, Töpfer-Petersen E.** Boar spermadhesin PSP-II: Location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS Lett* 1995, **365**, 179-182.
4. **Carbonell X, Villaverde A.** Protein aggregated into bacterial inclusion bodies does not result in protection from proteolytic digestion. *Biotechnol. Lett.* 2002, **24**, 1939-1944.
5. **Carrio MM, Villaverde A.** Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett.* 2001, **489**, 29-33.
6. **Ekhlesi-Hundrieser M, Calvete JJ, Von Rad B, Hettel C, Nimtz M, Töpfer-Petersen E.** Point mutations abolishing the mannose-binding capability of boar spermadhesin AQN-1. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008, **1784**, 856-862.
7. **Hannig G, Makrides SC.** Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 1998, **16**, 54-60.
8. **Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Stahl S.** Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2002, **35**, 91-105.
9. **Melo LM, Teixeira DI, Havt A, Cunha RM, Martins DB, Castelletti CH, de Souza PR, Filho JL, Freitas VJ, Cavada BS, Rádis-Baptista G.** Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Mol Reprod Dev.* 2008, **75**, 8-16.
10. **Melo LM, Nascimento AS, Silveira FG, Cunha RM, Tavares NA, Teixeira DI, Lima-Filho JL, Freitas VJ, Cavada BS, Rádis-Baptista G.** Quantitative

- expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). *Anim Reprod Sci.* 2009, **110**, 245-255.
11. **Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-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. *Andrology* 1997, **29**, 179-186.
  12. **Sørensen HP, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK.** Dialysis strategies for protein refolding. Preparative streptavidin production. *Protein Expr. Purif.* 2003, **32**, 252-259.
  13. **Teixeira DIA, Cavada BS, Sampaio AH, Havt A, Bloch C, Jr, Prates MV, Moreno FB, Santos EA, Gadelha CA, Gadelha TS, Crisóstomo FS, Freitas VJF.** Isolation and partial characterisation of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. *Prot Pep Lett* 2002, **9**, 331-335.
  14. **Teixeira DIA, Melo LM, Gadelha CAA, Cunha RMS, Bloch C, Jr, Rádiz-Baptista G, Cavada BS, Freitas VJF.** Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gen Mol Res* 2006, **5**, 79-87.
  15. **Thibault C, Fournier-Delpech S.** Acquisition of sperm fertilizing ability. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds.). *Reproduction in Mammals and Man*. Pp. 257-278, Ellipses, Paris, 1993.
  16. **Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ.** Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypothesis, and perspectives. *Andrologia* 1998, **30**, 217-224.
  17. **Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H.** The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci* 2005, **89**, 159-170.
  18. **Van den Berg B, Ellis RJ, Dobson CM.** Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* 1999, **18**, 6927-6933.

19. **Van Zutphen LFM, Balls M.** Animal Alternatives, Welfare, and Ethics. pp 1-260, Elsevier Science, Amsterdam, 1997.
20. **Varela PF, Romero A, Sanz L, Romão MJ, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ.** 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* 1997, 274, 635-649.
21. **Wempe F, Einspanier R, Scheit KH.** Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: Acidic seminal fluid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **183**, 232-237.

## 8. CONCLUSÕES

Antes deste estudo, a expressão de espermedesinas caprinas recombinantes nunca tinha sido descrita.

Um sistema de expressão eficiente foi obtido para disponibilizar uma base sólida para estudos das funções e das aplicações biotecnológicas das Bodesinas recombinantes.

## 9. PERSPECTIVAS

Após purificação por afinidade, a produção de anticorpos anti-Bdhr é mais provável. Estes anticorpos servirão como ferramentas para verificar o nível de expressão e as funções da Bodesina nativa a partir do plasma seminal.

Adicionalmente, a aplicação direta das Bodesinas recombinantes tem um grande potencial em relação ao conhecimento dos mecanismos de reprodução e das posteriores aplicações em biotecnologia reprodutiva.

Nós propomos que, após solubilização, as Bodesinas recombinantes mantêm seus prováveis efeitos biológicos. Assim, as espermedesinas caprinas recombinantes, especialmente Bdh-2 e Bdh-4 após solubilização podem ser utilizadas nesta investigação.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSERUY, A.M.; CALVETE, J.J.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; MELO, S.C.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into peritoneal cavity of rats. *Biol. Reprod.* v.67, p.1796-1803, 2002.
- ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; FEITOSA, R.F.G.; CUNHA, F.Q.; CALVETE, J.J.; RIBEIRO, R.A. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophage to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cell. *Biol. Reprod.* v.68, p.1836-1841, 2003.
- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major protein of RAM seminal plasma. v.71, p.461-470, 2005
- BORK, P.; BECKMANN, G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J. Mol. Biol.* v.231, p. 539-545.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; GIL, M.A.; CALVETE, J.J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARRILA, I.; GARCIA, E.M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; MARTÍNEZ, E.A. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *J. Andrology*, v.25, p.1004-1012, 2004.
- CABALLERO, I.; VÁZQUEZ, J.M.; MAYOR, G.M.; ALMIÑANA, C.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E.A. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *Jour. Androl.* Doi: 10.1111/j.1365-2605.2008.00887.x, 2008.
- CABALLERO, I.; VÁZQUEZ, J.M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; GIL, M.A.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; GARCIA, E.M.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E.A. Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. *Zygote*, v.13, p.11-16, 2005.
- CALVETE, J.J.; RAIDÁ, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin and

- phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett.* v.407, p.201-206, 1999.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma protein. *Soc. Reprod. Fertil.* v.65, p.201-216, 2007.
- CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: Effect of glycosylation on its heparin and gelatin-binding capabilities. *Biochem. Journ.* v. 310, p.615-622, 1995b.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; DOSTALOVA, Z.; TOPFER-PETERSEN, E. Spermadhesin: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. *Fertil.* v.11, p.35-40, 1995c.
- CALVETE, J.J.; SOLÍS, D.; SANZ, L.; DIAZ-MAURINO, T.; TOPFER-PETERSEN, E. Glycosylated boar spermadhesin AWN-1 isoforms: biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites and effect of glycosylation on binding. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, v.375, p.667-673, 1994.
- CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRALNETO, M. Revisiting Proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from end potential biotechnological use of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr. Prot. Pept. Sci.* v.02, p.123-135, 2001.
- CENTURIÓN, F.; VÁZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARRILLA, L.; GARCÍA, E.M.; MARTÍNEZ, E.A. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol. reprod.* v.69, p.640-646, 2003.
- DOSTALOVÀ, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Quantitation of boar spermadhesin in accessory sex gland fluids and on surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1200, p.48-54, 1994a
- DOSTALOVÀ, 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, v.375, p.457-461, 1994b
- DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Quantitation of boar spermadhesin in accessory sex gland fluids and on the surface of epidymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. Biochim. Biophys. Acta. v.200, p.48-54, 1994a.
- DOSTÀLOVÁ, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin AWN-1: Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristic. Eur. J. Biochem. v. 230, p.329-336, 1995a.
- DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J.J.; TOPFER-PETERSEN, E. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. Biol. Chem. Hoppe seyley. v.376, p.237-242, 1995b.
- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; GOHR, K.; WAGNER, A.; TSOLOVA, M.; PETRUNKINA, A.; TOPFER-PETERSEN, E. Spermadhesin AQN-1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. Biol. Reprod. v.73, p.536-545, 2005.
- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFER, B.; PHILIPP, U.; KUIPER, H.; LEEB, T.; MEHTA, M.; KIRCHHOFF, C.; TOPFER-PETERSEN E. Sperm-binding fibronectin type III-module proteins are genetically linked and functionally related. Gene, v.392, p.253-265, 2007.
- EINSPANIER, R.; EINSPANIER, A.; WENPE, F.; SCHEIT, K-H. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. Biochem. Biophys. Res. Comm. v.179, p. 1006-1010, 1991.
- 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. v.98, p.241-244, 1993.
- EINSPANIER, R.; KRAUSE, L.; CALVETE, J.J.; TOPFER-PETERSEN, E.; KLOSTERMEYER, H.; KARG, H. Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. FEBS Lett. v.344, p.61-64, 1994

- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SINOWATZ, F.; GREISER DE WILKE, I.; WABERSKI, D.; TOPFER-PETERSEN, E. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol. Reprod. Dev.* v.61, p.32-41, 2002.
- GARCIA, E.M.; VAZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; CABALLERO, I.O.; PARRILA, I.; GIL, M.A.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionally. *J. Andrology*, v.27, p.434-443, 2006.
- GARCIA, E.M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A.; VÁZQUEZ, J.M. Distinct effects of boar seminal plasma fractions exhibiting different protein profiles on the functionality of highly diluted boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* v.44, p.200-205, 2009.
- HAASE, B.; SCHLOTTERER, C.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KUIPER, H.; DISTIL, O.; TOPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene*. v.352, p.20-29, 2005.
- HAJTÓ, T.; HOSTANSKA, K.; BERKI, T.; PÁLINKAS, L.; BOLDIZSÁR, F.; NÉMETH, P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models and their possible relevance for clinical applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2, p.59-67, 2005.
- HOSHIBA, H.; SINOWATZ, F. Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. *Anat. Histol. Embryol.* v.27, p.351-353, 1998.
- KWOK, S.C.; YANG, D.; DAÍ, G.; SOARES, M.J.; CHEN, S.; MCMURTRY, J.P. Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I and PSP-II: new members of the spermadhesin family. *DNA Cell. Biol.* v.12, p.605-610, 1993a.
- KWOK, S.C.; YANG, D.; DAI, G.; SOARES, M.J.; CHEN, S.; MCMURTRY, J.P. Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. *Mol. Reprod. Dev.* v.35, p.244-250, 1993b.
- LEE, T.; SIEME, H.; TOPFER-PETERSEN, E. Genetic markers for stallion fertility – lessons from humans and mice. *Anim. Reprod. Sci.* v.89, p.21-29, 2005

- LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. *Glyc. Journ.* v.19, p.433-440, 2004.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Che. Rev.* v.98, p.637-674, 1998
- MELO, L.M.; NASCIMENTO, A.S.F.; SILVEIRA, F.G.; CUNHA, R.M.S.; TAVARES, N.A.C.; TEIXEIRA, D.I.A.; LIMA-FILHO, J.L.; FREITAS, V.J.F.; CAVADA, B.S.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the Buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). *Anim. Reprod. Scien.* v.110, p.245-255, 2009
- MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; HAVET, A.; CUNHA, R.M.S.; MARTINS, D.B.G.; CASTELLETTI, C.H.M.; SOUZA, P.R.E.; LIMA-FILHO, J.L.; FREITAS, V.J.F.; CAVADA, B.S.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Mol. Reprod. And Dev.* v.75, p.08-16, 2008
- NIMTZ, M.; GRABENHORST, E.; CONRADT, H.S.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Structural characterization of the oligosaccharide chains of native and crystallized boar seminal plasma spermadhesin PSP-I and PSP-II glycoforms. *Eur. J. Biochem.* v.265, p. 703-718, 1999.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin as plant defence proteins. *Plant Phys.* v.109, p.347-352, 1995.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: specific tools for the identificacion, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular biology.* v.33, p.209-258, 1998.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, W.J.M. P roposal For a novel sistem of nomenclature of plant lectins. *Lectin*, v.10, p. 105-117, 1995.
- REINERT, M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MANN, K.; TOPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur. Jour. of Biochem.* v.242, p.636-640, 1996.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; IBORRA, A.; MARTINEZ, P.; CALVETE, J.J. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar

- spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reprod. Fertil. Dev.* v.10, p.491-497, 1998.
- ROMÃO, M.J.; KOLLN, I.; DIAS, J.M.; CARVALHO, A.L.; ROMERO, A.; VARELA, P.F.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE J.J. Crystal structure of acid seminal fluid protein (aSFP) at 1.9Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. *J. Mol. Biol.* v.274, p.650-660, 1997
- ROMERO, A.; ROMÃO, M.J.; VARELA, P.F.; KOLLN, I.; DIAS, J.M.; CARVALHO, A.L.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. The crystal structure of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nature Struct. Biol.* v.04, p.783-788, 1997.
- SANZ, L.; CALVETE, J.J.; SCHAFFER, W.; MANN, K.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of two isoforms of a boar sperm zona pellucid-binding protein. *Biochim. Biophys Acta.* v.1119, p.127-132, 1992a.
- SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFFER, W.; SCHMID, E.R.; AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F.; EHRHARD, M.; TOPFER-PETERSEN E. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucid-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Letters*, v.300, p.213-218, 1992b.
- SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFFER, W.; SCHMID, E.R.; AMSELGRUBER, W.; TOPFER-PETERSEN, E. The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. *Eur. Jour. Of Biochem.* v.205, p.645-652, 1992c
- SANZ, L.; CALVETE, J.J.; JONAKOVA, V.; TOPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin AQN-1 and AWN are sperm-associated acrosin inhibitor acceptor protein. *FEBS Letter*, v.300, p.63-66, 1992d.
- SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K.; GABIUS, H.J.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* v.35, p.37-43, 1993.
- SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFFER, W.; SCHMID, E.R.; TOPFER-PETERSEN, E. The amino acid sequence of AQN-3, a carbohydrate-binding

- protein isolated from boar sperm. Location of disulphide bridges. *FEBS Lett.* v.01, p.33-36, 1991.
- SCHONECK, C.; EINSPANIER, R.; SCHALLENRGER, E.; SCHAMS, D. Effects of the bovine seminal protein aSFP: protection of spermatozoa and rapid uptake by the female mucosa. *J. Reprod. Fertil.* v.12, p. 21-31, 1993.
- SHARON, N.; LIS, H. Review: History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycob.* v.14, p.53-62, 2004.
- SINOWATZ, F.; AMSELGRUBER, W.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J.; SANZ, L. PLENDL, J. Immunocytochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract. *Cell Tiss. Res.* v.282, p.175-179, 1995.
- SOLIS, D.; ROMERO, A.; JIMÉNEZ, M.; DÍAZ-MAURINO, T.; CALVETE, J.J. Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-I, a member of the spermadhesin protein family. *FEBS Lett.* v.431, p.273-278, 1998.
- TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRIA, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem* v.267, p.6175-6179, 2000.
- TEIXEIRA, D.I.A.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H.; HAVT, A.; BLOCH, C. Jr.; PRATES, M.V.; MORENO, F.B.; SANTOS, E.A.; GADELHA, C.A.; GADELHA, T.S.; CRISÓSTOMO, F.S.; FREITAS, V.J.F. Isolation and partial characterization of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. *Prot. Pep. Lett.* v.09, p.331-335, 2002.
- TEIXEIRA, D.I.A.; MELO, L.M.; GADELHA, C.A.A.; CUNHA, R.M.S.; BLOCH JR, C.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; CAVADA, B.S.; FREITAS, V.J.F. Ion-exchange chromatography used to isolated a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gen. Mol. Rev.* v.05, p.79-87, 2006.
- THIBAUT, C.; FOURNIER-DELPECH, S. Acquisition of sperm fertilizing ability. *Reprod. in mammals and man.* p. 257-278, 1993.
- TOPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interaction on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reproduction Update.* v.05, p.314-329, 1999.

- TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucid-binding molecules: structure-function correlation of boar spermadhesin. *J. Reprod. Fertil.* v.50, p.55-61, 1996.
- TOPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal protein in fertilisation. *Anim. Reprod. sci.* v.89, p.159-170, 2005a.
- TOPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; TSOLOVA, M.; LEEB, T.; KIRCHHOFF, C.; MULLER, P. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Androl.* v.37, p.202-204, 2005b.
- TOPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.F.; EKHLASHI-HUNDRIESER, M.; DOSTALOVA, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, tryptophans and perspectives. *Andrologia.* v.30, p.217-224, 1998.
- VAN DAMME, E.J.M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different manose-binding lectin from tulip bulbs. *Eur. Jour. Biochem.* v.236, p.419-427, 1996.
- VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Plan. Scienc.* v.17, p.575-692, 1998.
- VARELA, P.F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMÃO, M.J.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. *J. Mol. Biol.* v.274, p.635-649, 1997.
- WAGNER, A.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; HETTEL, C.; PETRUNKINA, A.; WABERSKI, D.; NIMTZ, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Crabohadrate-based interactions of ovicuctal sperm reservoir formation-studies in the pig. *Mol. Reprod. Dev.* v.61, p.249-257, 2002.
- WANG, S.; PANTER, K.E.; EVANS, R.C.; BUNCH, T.D. The effects of pokeweed mitogen (PWN) and phytohemagglutinin (PHA) on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Anim. Reprod. Scienc.* v.67, p.215-220, 2001.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of RAM spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.* v.62, p.483-492, 1981.

WENPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K.H. Characterization by cDNA cloning of the messenger-RNA of a new growth-factor from bovine seminal plasma – acidic seminal fluid protein. *Biochem. and Biophys. Resear. Commun.* v.183, p.232-237, 1992.