



Universidade Federal do Ceará

Centro de Ciências

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Doutorado em Bioquímica

**GENES DAS ESPERMADESINAS DE CAPRINO (*Capra hircus*):
CLONAGEM MOLECULAR E PERFIL DE EXPRESSÃO
NO TRATO REPRODUTOR MASCULINO**

Luciana Magalhães Melo

Fortaleza, Ceará

2007

Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Doutorado em Bioquímica

GENES DAS ESPERMADÉSINAS DE CAPRINO (*Capra hircus*):
CLONAGEM MOLECULAR E PERFIL DE EXPRESSÃO
NO TRATO REPRODUTOR MASCULINO

Luciana Magalhães Melo

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica,
como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará

Fortaleza, Ceará

2007

M485g Melo, Luciana Magalhães
Genes das espermadésinas de caprino (*Capra hircus*): clonagem molecular e perfil de expressão no trato reprodutor masculino / Luciana Magalhães Melo, 2007.
160 f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Co-Orientador: Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista
Área de concentração: Bioquímica Vegetal
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2007.

1. Lectina 2. RT-PCR 3. Vesícula seminal 4. cDNA 5. Expressão gênica I. Cavada, Benildo Sousa (orient.) II. Rádis-Baptista, Gandhi (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica IV. Título

CDD 574.192

Esta Tese foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Luciana Magalhães Melo

Tese aprovada em: 27/07/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Com. Benildo Sousa Cavada

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade Federal do Ceará

Orientador

Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista

Departamento de Bioquímica e Biofísica

Universidade Federal de Pernambuco

Co-orientador

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade Federal do Ceará

Membro

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Departamento de Bioquímica e Biofísica

Universidade Federal de Pernambuco

Membro

Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota

Departamento de Patologia

Universidade Federal do Ceará

Membro

"Os homens não conhecem o que conhecem os deuses.
O que, às vezes, os homens consideram como uma verdadeira desgraça,
nada mais é que um verdadeiro bem para seu aperfeiçoamento moral"

Sócrates

Aos homens da minha vida, Vicente e Caio,
por todas as horas de convivência perdidas.

Aos meus pais, Ana e Luciano,
pelo amor que sempre me dedicaram.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Com. Benildo Sousa Cavada, pela acolhida em seu laboratório, pela confiança e por todas as oportunidades ofertadas. Agradeço, principalmente, pelo exemplo de pesquisador, pela orientação, além da paciência com todos os meus erros.

Ao professor Dr. Gandhi Rádís Baptista, pela iniciação na pesquisa em biologia molecular, pela orientação em todas as etapas deste trabalho. Agradeço, em especial, pelo exemplo de pesquisador, pela “amizade sem fronteiras”, e por me ensinar a “transpirar trabalho”.

Ao professor Dr. José Luiz de Lima Filho e a todos os componentes do LIKA-UFPE, em especial, Danyelly Brunaska, Carlos Castelletti e Paulo de Souza, que me acolheram com muita hospitalidade e ajudaram na execução dos experimentos de seqüenciamento de nucleotídeos e RT-PCR em tempo-real, em Recife.

Às professoras Dra. Cristiane Cunha Frota, Dra. Ilka Maria Vasconcelos, Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy, pelas sugestões e observações dadas na avaliação deste trabalho.

Ao professor MSc. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, a sua esposa e a todos os componentes do NUBIS-UVA, pelos experimentos de seqüenciamento de nucleotídeos, realizados em meio a muita receptividade e “calor” humano, em Sobral.

Ao professor Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas e aos membros do LFCR-UECE, que foram indispensáveis na seleção, manutenção e acompanhamento dos animais experimentais, bem como nas etapas cirúrgicas e de colheita dos tecidos.

Aos membros do Biomol-Lab: Raquelzinha, Taianá (Fofinha), Samita, Cichinho, Felipe (Natura), Bruno, Gustavito, Vitinho, Manel Prata, Duárdico, Menino Tales, Kyria, Ramonzim, Julinha, Larita, Plínio, Manel Marinho, Liazinha e Meninos da Pesca (Felipe, Jônatas, Rafael e Átila), meus grandes amigos, que além de me ensinarem as mais diversas técnicas em bioquímica, me deram o prazer incomensurável da convivência no trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, na figura dos professores, alunos e funcionários, pela convivência e aprendizado proporcionados durante meu doutorado.

À minha amada família, em especial: ao meu filhote, Caio, pelo grande tempo cedido de sua ainda tão pequena vida; ao meu querido esposo, Vicente, pelo amor, pela orientação extracurricular e pelo incentivo constante, e aos meus amados pais, Ana e Luciano, por “beijarem” meu filho e adoçarem minha vida, além do eterno incentivo ao crescimento profissional.

A Deus, pela dádiva da vida, com todas as suas oportunidades maravilhosas.

FONTES FINANCIADORAS E APOIO LOGÍSTICO

O suporte financeiro para execução deste trabalho foi fornecido pelas seguintes instituições:

- CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) através da manutenção de minha Bolsa de Doutorado, no período de agosto de 2004 a agosto de 2007.

- FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) através do financiamento deste projeto.

- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) através do programa PROAP para aquisição de material de consumo.

Adicionalmente, a realização desta pesquisa foi possível graças às instalações e aos equipamentos existentes nas seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará, representada pelo Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), sob liderança do professor Com. Benildo Sousa Cavada.

- Universidade Estadual do Vale do Acaraú, representada pelo Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), sob chefia do professor MSc. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.

- Universidade Federal de Pernambuco, representada pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), sob chefia do professor Dr. José Luiz de Lima Filho.

- Universidade Estadual do Ceará, representada pelo Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), sob chefia do professor Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas.

SUMÁRIO

	PAG.
LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABELAS.....	6
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES.....	8
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA.....	15
OBJETIVO GERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<i>CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</i>	18
1. Proteínas do plasma seminal.....	19
2. Espermadesinas suínas.....	20
2.1. PSP-I e PSP-II.....	22
2.2. AQN-1, AQN-3 e AWN.....	25
3. Espermadesinas bovinas: SPADH-1 (aSFP) e SPADH-2 (Z13).....	27
4. Espermadesina eqüina: HSP-7 (SSP-7).....	29
5. Espermadesina ovina: RSP-15,5 kDa.....	30
6. Espermadesina caprina: BSFP.....	30
7. Referências bibliográficas.....	31
<i>CAPÍTULO II – BODESINAS: CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS cDNAs.....</i>	43
1. Introdução.....	44
2. Material e métodos.....	45
2.1. Animal e obtenção dos tecidos: testículo e vesícula seminal.....	45
2.2. Isolamento do RNA total.....	47
2.3. Isolamento do RNA mensageiro.....	48
2.4. Amplificação rápida da extremidade 3' do cDNA (3'-RACE).....	49

2.4.1. Síntese da primeira fita de cDNA.....	49
2.4.2. Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação.....	50
2.4.3. Clonagem molecular da extremidade 3' do cDNA em bactéria.....	51
I-) Subclonagem em vetor plasmidial.....	51
II-) Preparação de células bacterianas competentes.....	51
III-) Transformação.....	52
IV-) Seleção das células recombinantes.....	52
V-) Propagação dos clones e purificação dos plasmídeos.....	53
2.4.4. Seqüenciamento de nucleotídeos.....	54
2.4.5. Análise das seqüências.....	55
2.5. Amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (5'-RACE).....	55
2.5.1. Síntese da primeira fita de cDNA.....	55
2.5.2. Purificação do cDNA fita simples.....	56
2.5.3. Construção da cauda homopolimérica do cDNA.....	57
2.5.4. Amplificação: 1°. PCR.....	57
2.5.5. Amplificação: 2°. PCR (<i>Nested amplification</i>).....	57
2.5.6. Clonagem molecular da extremidade 5' do cDNA em bactéria, seqüenciamento de nucleotídeos e análise das seqüências.....	58
3. Resultados.....	58
3.1. Animais, tecidos, RNA total, RNA mensageiro e cDNA.....	58
3.2. Amplificação e clonagem da extremidade 3' do cDNA.....	60
3.3. Amplificação e clonagem da extremidade 5' do cDNA.....	63
3.4. Análise das seqüências nucleotídicas.....	64
4. Discussão.....	70
5. Referências bibliográficas.....	73

CAPÍTULO III – PERFIL DE EXPRESSÃO DAS BODESINAS NO TRATO REPRODUTOR DO MACHO CAPRINO (*Capra hircus*).....

1. Introdução.....	78
2. Material e métodos.....	79
2.1. Animal e obtenção dos tecidos.....	79
2.2. Isolamento do RNA total.....	79

2.3. Transcrição reversa.....	81
2.4. Construção das curvas-padrão de cDNA	81
2.5. PCR em tempo real.....	82
2.6. Cálculos e análise estatística.....	84
3. Resultados.....	86
4. Discussão.....	97
5. Referências bibliográficas.....	101
CAPÍTULO IV: ANEXOS.....	106
ANEXO 1: Buck (<i>Capra hircus</i>) genes encode new members of the spermadhesin family. <i>Molecular Reproduction and Development</i> , v.75, p.8-16, 2008. (DOI: 10.1002/mrd.20757).....	107
ANEXO 2: Quantitative expression analysis of Bodesin genes in buck (<i>Capra hircus</i>) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). <i>Animal Reproduction Science</i> , Submitted, 2007.....	117
ANEXO 3: Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (<i>Capra hircus</i>) seminal plasma. <i>Genetics and Mol. Res.</i> , v.5, p.79–87, 2006.	129
ANEXO 4: Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-1 (Bdh-1) registrada no GenBank.....	139
ANEXO 5: Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-2 (Bdh-2) registrada no GenBank.....	141
ANEXO 6: Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-3 (Bdh-3) registrada no GenBank.....	144
ANEXO 7: Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-4 (Bdh-4) registrada no GenBank	145
ANEXO 8: Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-1 (Bdh-1) em vetor de expressão pTrcHis–TOPO.....	147
ANEXO 9: Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-2 (Bdh-2) em vetor de expressão pTrcHis-TOPO.....	149

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

FIGURA 1.1. Representação tridimensional do heterodímero PSP-I/PSP-II mostrando o resíduo de N-acetilglicosamina ligado a asparagina 50 de PSP-I (A) e os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos flanqueados por resíduos polares, presentes na interface entre PSP-I e PSP-II (B). Adaptado de VARELA *et al.* (1997).

FIGURA 1.2. Representação tridimensional da molécula de PSP-II, apresentando o sítio de ligação ao tetrassacarídeo de heparina (A) e os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com Manose-6-fosfato (B). Adaptado de SOLIS *et al.*, (1998).

FIGURA 1.3. Estrutura molecular tridimensional de aSFP. (A) Sobreposição das cadeias carbônicas dos domínios CUB de aSFP (vermelho) e PSP-I (verde), mostrando o núcleo hidrofóbico conservado em ambas as estruturas. (B) Representação estérica dos locais de ligação a átomos pesados (esferas marrons) destacando os resíduos de aminoácidos envolvidos e as duas conformações possíveis da ponte dissulfeto entre Cys54-Cys75. Adaptado de ROMÃO *et al.* (1997).

FIGURA 1.4. Modelo tridimensional proposto para Z13. Os resíduos de cisteína estão representados em preto. Em destaque encontra-se o quinto resíduo de cisteína (C89) peculiar a essa espermedesina. Adaptado de TEDESCHI *et al.* (2000).

CAPÍTULO II – BODESINAS: CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS cDNAs

FIGURA 2.1. Exemplo de macho da espécie caprina (*Capra hircus*) sem raça definida.

FIGURA 2.2. Aparelho reprodutor masculino na espécie caprina (*Capra hircus*). (A) Secção sagital longitudinal da região pélvica de um espécime. (B) Desenho esquemático apresentando a localização anatômica dos principais órgãos, glândulas acessórias e ductos.

FIGURA 2.3. Representação esquemática da estratégia experimental para amplificação rápida da extremidade 5' (5'-RACE) do mRNA da espermedesina caprina. SDM-AS1 e SMD-

AS2 = *oligonucleotídeos* antisenso específicos complementares à extremidade 3' do mRNA da espermedesina caprina. AAP e AUAP = *oligonucleotídeos* universais fornecidos no Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

FIGURA 2.4. Eletroforese em gel de agarose a 1% do cDNA total de vesícula seminal (VS) e de testículo (T) de caprino (*Capra hircus*). M = marcador de massa molecular.

FIGURA 2.5. Amplificação da extremidade 3' do cDNA de vesícula seminal (VS) e de testículo (T) de caprino (*Capra hircus*) utilizando os *oligonucleotídeos* Q0 e SMD-SE2. Os amplicons em VS são os genes das espermedesinas caprinas (Bodesinas). M = marcador de massa molecular.

FIGURA 2.6. Seleção de clones da extremidade 3' do cDNA de espermedesina caprina por *PCR colony*. Gel representativo de análise eletroforética dos produtos de PCR obtidos por amplificação utilizando os *oligonucleotídeos* SP6 e T7. 1 a 13 = numeração das amostras; M = marcador de massa molecular.

FIGURA 2.7. Seqüência de nucleotídeos dos cDNAs codificando três espermedesinas caprinas (Bodesinas). Bdh-1 = Bodesina-1; Bdh-2 = Bodesina-2; Bdh-3 = Bodesina-3. Letras em **negrito** = nucleotídeos que podem codificar para resíduos de aminoácidos diferentes entre as três isoformas; Letras com sublinhamento simples = região para o *oligonucleotídeo* senso específico SMD-SE2 usado para 3'-RACE; Letra com sublinhamento duplo = seqüência nucleotídica para término de tradução (codons de parada); Letras em *itálico* = seqüência nucleotídica para sinal de poliadenilação.

FIGURA 2.8. Amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (5'-RACE) de vesícula seminal de caprino (*Capra hircus*) utilizando os *oligonucleotídeos* SMD-AS1 e AAP. Os amplicons em são os genes das espermedesinas caprinas (Bodesinas). M = marcador de massa molecular.

FIGURA 2.9. Amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (5'-RACE) de vesícula seminal de caprino (*Capra hircus*) utilizando os *oligonucleotídeos* SMD-AS2 e AUAP. Os amplicons em são os genes das espermedesinas caprinas (Bodesinas). 1 = 1°. PCR utilizando cDNA de fitas simples como molde; 2 = PCR utilizando cDNA de fitas simples como molde

e os oligonucleotídeos SMD-SE2 e SMD-AS2; 3 = PCR utilizando clone de Bdh-2 com molde e os oligonucleotídeos SMD-SE2 e SMD-AS2; M = marcador de massa molecular.

FIGURA 2.10. Seleção de clones da extremidade 5' do cDNA de espermedesina caprina por *PCR colony*. Gel representativo de análise eletroforética dos produtos de PCR obtidos por amplificação utilizando os *oligonucleotídeos* M13F e M13R. 1 a 16 = numeração das amostras; M = marcador de massa molecular.

FIGURA 2.11. Seqüência de nucleotídeos do cDNA codificando a espermedesina caprina Bodesina-4 (Bdh-4). Letras em *itálico* = seqüência nucleotídica identificada por 5'-RACE; Letras em **negrito** = nucleotídeos que podem codificar para resíduos de aminoácidos diferentes entre as isoformas de bodesinas; Letra com sublinhamento duplo = seqüência nucleotídica para término de tradução (codons de parada); Letras com sublinhamento simples = região para o *oligonucleotídeo* antisense específico SMD-AS2 usado para 5'-RACE (inclusive codons de parada).

FIGURA 2.12. Seqüência nucleotídica dos cDNAs codificando quatro isoformas de espermedesinas caprinas, denominadas Bdh-1, Bdh-2, Bdh-3 and Bdh-4. Letras sombreadas em cinza = nucleotídeos que podem codificar para resíduos de aminoácidos diferentes entre as isoformas de bodesinas; Letras com sublinhamento simples = região para os oligonucleotídeos específicos denominados SMD-SE2 e SMD-AS2, usados para 3'-RACE e 5'-RACE; Letras com sublinhamento duplo = seqüência nucleotídica codificando o peptídeo sinal; Letras em **negrito** = seqüência nucleotídica codificando a região N-terminal de Bdh-4. Letras em *itálico* e **negrito** = sinal de poliadenilação.

FIGURE 2.13. Tradução da seqüência nucleotídica do cDNA que codifica a espermedesina caprina, Bdh-4. Letras com sublinhamento duplo = seqüência nucleotídica codificando o peptídeo sinal; Letras em **negrito** = seqüência nucleotídica codificando a região N-terminal de Bdh-4 madura; Stop = códon de parada.

FIGURA 2.14. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos do peptídeo sinal (A) e das espermedesinas maduras (B) de bode, varrão, garanhão e touro. As características dos resíduos de aminoácidos que definem a assinatura (CUB sign – VARELA *et al.*, 1997) e a posição dos elementos de estrutura secundária (CUB pred – BORK & BERCKMANN, 1993)

do domínio CUB estão apresentadas usando o seguinte código: a, aromáticos (Phe, Tyr, Trp); h, hidrofóbicos (Leu, Ile, Val, Met, Ala); t, *turn-like* ou polares (Gly, Pro, Asn, Gln, His, Ser, Thr); n, carregados negativamente (Glu, Asp); p, carregados positivamente (Arg, Lys); β , β -strands (marcadas de β a até β i). As duas pontes dissulfeto (S-S) entre resíduos de cisteína (C) vizinhos, os quais estão conservados em todas as moléculas de espermedesina conhecidas e em alguns domínios CUB, estão sombreados em cinza. Os resíduos de aminoácidos diferentes entre as espermedesinas estão mostrados em caixas. Foram usadas as seqüências das espermedesinas de *Sus scrofa* (CAI05910, CAI05911, CAI05914), *Equus caballus* (P80720) e *Bos taurus* (AAA30745).

CAPÍTULO III – PERFIL DE EXPRESSÃO DAS BODESINAS NO TRATO REPRODUTOR DO MASCULINO DE CAPRINO (Capra hircus)

FIGURA 3.1. Localização das seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real das espermedesinas caprinas. Seqüências nucleotídicas dos cDNAs que codificam as três isoformas de espermedesinas caprinas (bodesinas), denominadas Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3. Caixas cinzas = nucleotídeos que podem codificar para resíduos de aminoácidos diferentes entre as isoformas de bodesinas; Letras com sublinhamento duplo = região para o *oligonucleotídeo* senso específico denominados BDH-SE; Letras com sublinhamento simples = região para os *oligonucleotídeos* antisenso específicos denominados BDH-AS1, BDH-AS2 e BDH-AS3.

FIGURA 3.2. Sistema para realização de PCR em tempo real. (A) Equipamento Rotor Gene 3000, acoplado a um computador. (B) Ilustração de uma corrida típica utilizando o software Rotor Gene 6.0.19.

FIGURA 3.3. Curvas de fluorescência *versus* número de ciclos para amplificação em tempo real das bodesinas (Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3) e dos genes de referência β -actina e β -globina, utilizando cDNA de vesícula seminal (VS), testículo (TS), epidídimo (EP), glândulas bulbo-uretrais (BU) e ducto deferente (DD). A fluorescência está plotada em unidades arbitrárias. * = sinal de fluorescência abaixo do limiar (*threshold*) durante todos os ciclos.

FIGURA 3.4. Curvas de *melting* para os produtos de amplificação em tempo real das bodesinas (Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3) utilizando os plasmídios os purificados pBDH-1, pBDH-2 e pBDH-3 ou os cDNAs de vesícula seminal (VS), testículo (TS), epidídimo (EP), glândulas bulbo-uretrais (BU) e ducto deferente (DD).

FIGURA 3.5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos das amplificações das bodesinas em tecidos do trato reprodutor do bode. VS = vesícula seminal; TS = testículo; EP = epidídimo; BU = glândulas bulbo-uretrais; DD = ducto deferente. O cDNA foi omitido nas reações de controle negativo (W). Plasmídios contendo insertos de bodesinas (pBDH-1, pBDH-2 e pBDH3) foram usados como molde nas reações de controle positivo (C+). Um marcador de tamanho molecular de 50 pb foi utilizado.

FIGURA 3.6. Quantificação relativa dos níveis de transcrição das bodesinas em vesícula seminal, acessada através de PCR em tempo real. *Os valores estão normalizados para a quantidade inicial de RNA total (ng). Bdh-1 = bodesina 1; Bdh-2 = bodesina 2; Bdh-3 = bodesina 3.

FIGURA 3.7. Comparação das eficiências de reações de PCR em tempo real para amplificação das bodesinas 1, 2 e 3. Curvas de Ct *versus* concentração de DNA (cDNA transcrito reversamente a partir de RNA total de vesícula seminal ou DNA plasmidial contendo insertos de bodesinas, pBDH-1, pBDH-2 ou pBDH3).

FIGURA 3.8. Quantificação dos níveis de transcrição das bodesinas 1, 2 e 3 em testículo (TS), epidídimo (EP), glândulas bulbo-uretrais (BU) e ducto deferente (DD), relativo a vesícula seminal (VS). Bdh-1A, Bdh-2A e Bdh-3A = valores para as bodesinas 1, 2 e 3, respectivamente, normalizados para o gene de referência β -actina. Bdh-1G, Bdh-2G e Bdh-3G = valores para as bodesinas 1, 2 e 3, respectivamente, normalizados para o gene de referência β -globina.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – BODESINAS: CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS cDNAs

TABELA 2.1. Oligonucleotídeos universais utilizados para 3'-RACE, 5'-RACE e clonagem das espermadesinas de caprino (*Capra hircus*)

TABELA 2.2. Oligonucleotídeos específicos utilizados para 3'- RACE, 5'-RACE e clonagem das espermadesinas de caprino (*Capra hircus*)

TABELA 2.3. Parâmetros qualitativos e quantitativos mensurados no processo de purificação de RNA total a partir de vesícula seminal e testículo de caprino

TABELA 2.4. Parâmetros qualitativos e quantitativos mensurados no processo de purificação de RNA mensageiro a partir de vesícula seminal e testículo de caprino

TABELA 2.5. cDNA de espermadesinas de caprino (*Capra hircus*), suíno (*Sus scrofa*) e bovino (*Bos taurus*)

CAPÍTULO III – PERFIL DE EXPRESSÃO DAS BODESINAS NO TRATO REPRODUTOR DO MASCULINO DE CAPRINO (Capra hircus)

TABELA 3.1. Oligonucleotídeos específicos utilizados para amplificação em tempo real das espermadesinas de caprino (Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3)

TABELA 3.2. Parâmetros qualitativos e quantitativos mensurados no processo de purificação de RNA total a partir dos tecidos do trato reprodutor de caprino

TABELA 3.3. Valores médios de temperatura de *melting* (T_m) calculados para os produtos de PCR em tempo real utilizando clones de bodesinas e cDNA de vesícula seminal

TABELA 3.4. Valores médios de temperatura de *melting* (T_m) calculados para os produtos de PCR em tempo real utilizando cDNA (transcrito reversamente a partir de 3,6ng/ μ L de RNA total) de testículo (TS), glândula bulbo-uretral (BU) e epidídimo (EP)

TABELA 3.5. Valores médios de Ct (*Threshold cycle*) calculados através de PCR em tempo real utilizando plasmídios com insertos de bodesinas (pBDH-1, pBDH-2 e pBDH3), um *oligonucleotídeo* senso BDH-SE e diferentes *oligonucleotídeos* antisenso específicos (BHD-AS1, BHD-AS2 e BHD-AS3)

TABELA 3.6. Variação intra-experimento para valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos a partir de PCR em tempo real utilizando cDNA de vesícula seminal (transcrito reversamente a partir de RNA total)

TABELA 3.7. Variação intra-experimento para valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos a partir de PCR em tempo real utilizando DNA plasmidial de clones das bodesinas

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AAP e AUAP =	Oligonucleotídeos universais utilizados em 5'-RACE
Abs ₂₆₀	Absorbância medida a 260 nm de comprimento de onda
Abs ₂₈₀	Absorbância medida a 280 nm de comprimento de onda
AQN =	Espermadesina suína
aSFP =	Proteína ácida do plasma seminal (<i>acidic Seminal Fluid Protein</i>)
AWN =	Espermadesina suína
β-ACT-AS =	Oligonucleotídeo anti-senso específico para β-actina
β-ACT-SE =	Oligonucleotídeo senso específico para β-actina
β-GLO-AS =	Oligonucleotídeo anti-senso específico para β-globina
β-GLO-SE =	Oligonucleotídeo senso específico para β-globina
Bdh-1 =	Bodesina-1 (ou <i>Bodhesin-1</i>)
Bdh-2 =	Bodesina-2 (ou <i>Bodhesin-2</i>)
Bdh-3 =	Bodesina-3 (ou <i>Bodhesin-3</i>)
BDH-AS =	Oligonucleotídeo anti-senso específico para bodesina usado em qRT-PCR
BDH-SE =	Oligonucleotídeo senso específico para bodesina usado em qRT-PCR
BSFP =	Proteína do plasma seminal do bode (<i>Buck Seminal Fluid Protein</i>)
BU =	Glândula bulbo-uretral
CEUA =	Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará
cDNA =	DNA complementar ao RNA mensageiro
CRD =	Domínio de reconhecimento a carboidrato
CRISPs =	Proteínas secretórias ricas em cisteína (<i>Cystein Rich Secretory Proteins</i>)
CRISP-1 =	Glicoproteína ácida epididimária-1(ou AEG-1)
CRISP-2 =	Proteínas expressas principalmente no testículo (ou TPX-1)
CRISP-3 =	Glicoproteína ácida epididimária-2 (ou AEG-2)
Ct =	Ciclo limiar (<i>Threshold cycle</i>)
CUB =	Domínio protéico
DD =	Ducto deferente
DEPC	Dietilpirocarbonato
DQH =	Proteína do plasma seminal suíno
dNTP =	Desoxinucleosídeo trifosfato
E =	Eficiência
EDTA =	Ácido etilenodiaminotetracético
EP =	Epidídimo
EST =	Etiqueta de sequência expressa (<i>Expressed Sequence Tag</i>)

Fn-tipo II =	Fibronectinas do tipo II
HPLC =	Cromatografia líquida de alta performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSP-7 =	Proteína do plasma seminal eqüina (<i>Stallion Seminal plasma Protein</i> , ou SSP-7)
IA	Inseminação artificial
Kb =	kilobases
kDa	kiloDaltons
MALDI-TOF =	Tipo de espectometria de massa (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>)
M-MLV-RT =	Transcriptase reversa do vírus Moloney da leucemia murina (<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>)
ORF =	Região aberta de leitura (<i>Open reading frame</i>)
pb =	pares de base
pBDH-1 =	Plasmídeo contendo inserto de Bdh-1
pBDH-2 =	Plasmídeo contendo inserto de Bdh-2
pBDH3 =	Plasmídeo contendo inserto de Bdh-3
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PSP-I =	Porcine Seminal plasma Protein I (proteína do plasma seminal de suíno I)
PSP-II =	Porcine Seminal plasma Protein II (proteína do plasma seminal de suíno II)
PT =	Próstata
Q0 =	Oligonucleotídeo universal complementar a QT
RSP =	Ram Seminal plasma Protein (proteína do plasma seminal de carneiro)
RT-PCR =	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase acoplada a transcrição reversa)
qRT-PCR =	Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase quantitativa acoplada a transcrição reversa)
QT =	Adaptador oligo-(dT) para a extremidade 3' do RNA mensageiro
R ² =	Coefficiente de correlação de Pearson
R _{260/280} =	Razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm
3'-RACE =	Amplificação rápida da extremidade 3' do cDNA
5'-RACE =	Amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA
[RNA] =	Concentração de RNA
RNA _m =	RNA mensageiro
RNases =	Enzimas que degradam RNA
RSPs =	Proteína do plasma seminal de carneiro (<i>Ram Seminal plasma Protein</i>)
S =	Inclinação da curva (<i>Slope</i>)

SAAIs =	Inibidores de acrosina associados à superfície do espermatozóide
SDS =	Dodecil sulfato de sódio
SBG =	Glicoproteína ligante ao espermatozóide (<i>Sperm Binding Glycoprotein</i>)
SMD-AS =	Oligonucleotídeo anti-senso específico para bodesina
SMD-Se =	Oligonucleotídeo senso específico para bodesina
SP6, T7, M13R e M13F =	Oligonucleotídeos universais complementares a seqüência de pGEM-T easy
SSP-7 =	Proteína do plasma seminal do garanhão (<i>Stallion Seminal plasma Protein</i>)
T _m =	Temperatura de anelamento (<i>melting Temperature</i>)
Tris-HCl =	Solução tampão contendo tris(hidroximetil)aminometano e ácido clorídrico
TS =	Testículo
VS =	Vesícula seminal
ZP =	Receptores da zona pelúcida do oócito
Z13 =	Espermadesina bovina (ou SPADH-2)

RESUMO

O trato genital masculino expressa diferentes classes de genes, cujas proteínas estão envolvidas na remodelagem da superfície do espermatozóide, a qual ocorre durante o trânsito espermático através do trato genital e continua após a ejaculação. Nesse processo de maturação espermática pós-testicular, o espermatozóide adquire a capacidade de fecundar o oócito. Nas espécies unguladas, proteínas denominadas espermadesinas, pertencendo a uma nova família de lectinas animais, são uma das principais proteínas do plasma seminal. Estes polipeptídeos multifuncionais de baixa massa molecular (12 a 16 kDa) são capazes de influenciar diversas funções reprodutivas, como a capacitação espermática, estabilização do acrossoma, e a fusão espermatozóide-oócito durante o processo de fecundação, através da capacidade de reconhecer ligantes tão diversos quanto carboidratos, inibidores de proteinases, fosfolipídeos, e glicoproteínas da zona pelúcida. Em estudo preliminar, nosso grupo isolou um polipeptídeo de 12,6 kDa do plasma seminal, denominado BSFP (Proteína do Plasma Seminal do Bode), o qual foi estruturalmente caracterizado como a primeira espermadesina de caprino (*Capra hircus*). A BSFP compartilha 50% de similaridade com as espermadesinas suínas AQN-1 e AWN, e não é capaz de ligar-se à heparina. No presente estudo nós objetivamos clonar e caracterizar os genes da espermadesina caprina (bodesina), incluindo o gene da BSFP, e investigar seus perfis de expressão através do trato reprodutor do macho por qRT-PCR. Inicialmente, os cDNAs de vesícula seminal e testículo foram preparados de um macho adulto. Após amplificação das extremidades 3' e 5' usando cDNA de vesícula seminal, nós clonamos e seqüenciamos quatro fragmentos de nucleotídeos extremamente similares (97 a 98%) codificando espermadesinas, as quais foram denominadas Bodesina-1, -2, -3 e -4. Todas as seqüências deduzidas de aminoácidos continham a assinatura do domínio CUB e foram 49 a 52% similares à AWN suína. Entre as quatro bodesinas, a Bodesina-2 foi a mais similar ao fragmento N-terminal da BSFP. Posteriormente, o RNA total de vesícula seminal (VS), testículo (TS), epidídimo (EP), glândula bulbo-uretral (BU) e ducto deferente (DD) foram transcritos reversamente e os cDNAs produzidos foram submetidos a qRT-PCR. Para cada gene homólogo da Bodesina, denominados Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3, um par de oligonucleotídeos específicos e plasmídeos recombinantes foram preparados para a dosagem dos genes. A especificidade das amplificações foi confirmada pela similaridade dos valores de temperatura *melting* de todos os produtos de PCR e pelo formato da curva *melting*. Na VS, onde os valores de expressão foram máximos, a quantificação foi absoluta, enquanto que nos outros tecidos a quantificação foi relativa à VS. Na VS do bode, Bdh-2 é o homólogo predominantemente expresso, com um número de cópias na ordem de milhões de vezes

superior a Bdh-1 e milhares de vezes a Bdh-3. O número de cópias de mRNA de Bdh-3 é somente dez vezes mais alto que Bdh-1. Os transcritos de bodesina foram detectados em todos tecidos examinados, com exceção de DD. Neste estudo, a análise quantitativa também demonstrou claramente a expressão diferencial da espermedesina em BU. As fortes diferenças na expressão dos genes das bodesinas indicam que cada isoforma pode ter uma função biológica específica no trato genital do bode, o que demanda estudos adicionais. Este trabalho é o primeiro no qual o perfil de expressão quantitativa de homólogos da espermedesina, ao longo do trato reprodutor do bode, é investigada por qRT-PCR.

ABSTRACT

The male genital tract expresses distinct classes of genes, whose proteins are involved in the remodelling of the sperm surface, which occurs during sperm transit through the genital tract and continues after ejaculation. In such process of post-testicular sperm maturation, the spermatozoa have the ability to fertilize an egg. In ungulate species, proteins named spermadhesins, belonging to a new family of animal lectins, are one of the main protein components of seminal plasma. These low molecular weight (12 to 16 kDa) multifunctional polypeptides are able to influence diverse reproductive functions, like spermatozoa capacitation, acrosome stabilization, and sperm-oocyte fusion during the fertilization process, through the ability to recognize ligands as diverse as carbohydrates, proteinase inhibitors, phospholipids, and zona pellucida-glycoproteins. In previous work, our group isolated a polypeptide of 12,6 kDa from the seminal plasma, named BSFP (*Buck Seminal Fluid Protein*), which was structurally characterized as the first buck (*Capra hircus*) spermadhesin. BSFP shares 50% of similarity with the swine AQN-1 and AWN spermadhesins, and is not able to bind to heparin. In the present study we aimed to clone and characterize the buck spermadhesin (bodhesin) genes, including BSFP gene, and to investigate their expression profile along the male reproductive tract by qRT-PCR. Initially, the cDNAs of the seminal vesicle and testis were prepared from a mature buck. Following 3'- and 5'-end amplifications using seminal vesicle cDNA, we cloned and sequenced four highly similar (97 to 98%) nucleotide sequences encoding spermadhesins, which were named Bodhesin-1, -2, -3 and -4. All deduced amino acid sequences contained the CUB domain signature and were 49 to 52% similar to boar AWN. Among the four Bodhesin amino acid sequences, Bodhesin-2 was the most similar to the BSFP N-terminal fragment. Subsequently, total RNAs from seminal vesicle (SV), testis (TS), epididymis (EP), bulbourethral gland (BU) and ductus deferens (DD) were reversed transcribed and the produced cDNAs were submitted to qRT-PCR. For each homologous bodhesin gene, namely Bdh-1, Bdh-2 and Bdh-3, a set of specific oligonucleotides and recombinant plasmids were prepared for gene dosage. The specificity of amplifications was corroborated by the similarity of melting temperature values of all PCR products, and by the melting curve formats. In SV, where the values of expression were maximal, the quantification was absolute, while in the other buck reproductive tissues the quantification was relative to SV. In buck seminal vesicle, Bdh-2 is the homologue predominantly expressed, with a copy number in the order of millions of times more than Bdh-1 and thousand times more than Bdh-3. The copy number of Bdh-3 mRNA is only ten

fold higher than Bdh-1. Bodhesin transcripts were detected in all exanimate tissues, except in DD. Here, the quantitative analysis also demonstrates clearly the differential expression of spermadhesin in BU. The striking differences in bodhesin gene expression indicate that each isoforms might have specific biological function in the buck genital tract, what deserves further studies. This work is the first in which the quantitative expression profile of spermadhesin homologues along the buck reproductive tract is investigated by qRT-PCR.

INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

A caprinocultura é considerada uma atividade milenar, na qual a carne e o leite têm grande importância como fontes básicas de proteína animal para diversos povos. O Brasil possui aproximadamente nove milhões de cabeças de caprinos, colocando-se como o 11º produtor mundial, segundo dados da FAO (2005). O efetivo de caprinos da região Nordeste representa cerca de 93% do rebanho nacional (IBGE, 2005), o que leva a caprinocultura a ser uma importante alternativa para o desenvolvimento social e econômico dessa região.

Nos últimos dez anos, ocorreram mudanças significativas para a consolidação da cadeia produtiva da caprinocultura no Brasil. Nesse período, a atividade despertou maior atenção de governantes, técnicos e produtores, acarretando a intensificação da pesquisa voltada para a produção animal, através do uso de modernas biotecnologias, como a inseminação artificial (IA) e a produção de embriões, tanto *in vivo* com *in vitro* (PIV). Essas pesquisas demandam o conhecimento aprofundado do processo reprodutivo em diversos aspectos, inclusive no âmbito molecular.

Uma vertente dessas pesquisas culminou com a descoberta de uma família de proteínas multifuncionais de baixa massa molecular (12 a 16 kDa) no plasma seminal de mamíferos: as espermadésinas. Essas moléculas exibem uma ampla variedade de ligantes, como inibidores de proteinase (SANZ *et al.*, 1992b), fosfolípídeos (DOSTALOVA *et al.*, 1995b), bem como carboidratos (SOLÍS *et al.*, 1998) e glicoproteínas da zona pelúcida (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1999, SANZ *et al.*, 1992a,b). Tal achado fez com que as mesmas fossem consideradas como uma nova família de lectinas animais, podendo, ainda, desempenhar diversas funções reprodutivas, atuando no processo de capacitação, estabilização do acrossoma ou, ainda, na interação entre gametas, durante a fecundação (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1998). Até o presente momento, essas proteínas já foram amplamente descritas na espécie suína (CALVETE *et al.*, 1994), bovina (EINSPANIER *et al.*, 1991) e eqüina (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005a), apresentando, assim, nessas espécies, potencial utilização em técnicas reprodutivas.

Recentemente, nosso grupo isolou uma proteína de 12,591 kDa de massa molecular, denominada BSFP (*Buck Seminal Fluid Protein*), a partir do plasma seminal de caprinos (TEIXEIRA *et al.*, 2002), a qual foi estruturalmente caracterizada como a primeira espermadésina caprina. Essa molécula apresentou cerca de 50% de similaridade com as espermadésinas suínas AQN-1 e AWN, e não apresentou capacidade de ligação a heparina (TEIXEIRA *et al.*, 2006). O baixo volume do plasma seminal dessa espécie apresenta-se

como uma forte barreira para a obtenção e, conseqüentemente, para o aprofundamento dos estudos estruturais e funcionais envolvendo essa biomolécula. Adicionalmente, as espermedesinas não apresentam qualquer atividade aglutinante (TEIXEIRA *et al.*, 2002; TICHA *et al.*, 1998). Tal fato dificulta sobremaneira a obtenção dessa lectina animal por métodos bioquímicos clássicos, envolvendo cromatografia e acompanhamento da atividade específica.

As modernas técnicas de biologia molecular têm permitido abordagens e investigações cada vez mais sensíveis e acuradas nos estudos das biomoléculas. Assim, uma estratégia promissora para o estudo da espermedesina caprina é a produção da proteína recombinante, possibilitando a obtenção dessa molécula em uma escala preparativa, suficiente para a realização de diversos estudos estruturais e funcionais. Com esse intuito, é necessário, inicialmente, identificar e caracterizar o gene que codifica essa lectina animal. Subseqüentemente, essas informações viabilizam investigações adicionais, como a distribuição e quantificação dessa biomolécula nos diferentes tecidos do trato reprodutor caprino. Em conjunto, esses estudos contribuem para incrementar nossos conhecimentos acerca dos mecanismos reprodutivos na espécie caprina, em especial aqueles envolvendo as espermedesinas.

OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar o gene que codifica a espermedesina de caprino (*Capra hircus*), bem como detectar sua expressão no trato reprodutor masculino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar e conhecer a estrutura completa o cDNA que codifica a espermedesina de caprino (*C. hircus*) a partir de RNAm obtido de vesícula seminal de bode.
- ✓ Verificar o nível de expressão dessa espermedesina em diferentes partes do trato reprodutor de caprino (vesícula seminal, bulbo-uretal, testículo, epidídimo, próstata e ducto deferente).

CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



1. Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal mamífero, líquido no qual os espermatozóides estão suspensos, é uma mistura complexa de secreções originadas do testículo, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, como vesícula seminal, ampola, próstata e glândulas bulbo-uretrais (JONAKOVÁ *et al.*, 2007). O plasma seminal contém fatores que influenciam os espermatozóides e o trato genital feminino durante o transporte espermático (YANAGIMACHI, 1994). Em especial, as proteínas do plasma seminal apresentam um papel na modulação da função dos espermatozóides antes que estes alcancem o oócito no local de fecundação, durante o reconhecimento dos gametas e quando espermatozóide e oócito ligam-se, durante a fecundação (CALVETE *et al.*, 1995b).

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 espermadesinas (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005b).

Fibronectinas do tipo II (Fn-tipo II) são proteínas seminais caracterizadas pela presença de dois (Fn-tipo II curta) ou quatro (Fn-tipo II longa) módulos conservados Fn-2 arranjados em seqüência (SCHÄFER *et al.*, 2003). As formas curtas são amplamente sintetizadas no trato genital masculino, enquanto as formas longas são expressas exclusivamente no epidídimo (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005). As Fn-tipo II encontram-se fortemente associadas à superfície do espermatozóide durante o trânsito epididimário e no momento da ejaculação, exercendo diversas ações na membrana plasmática, as quais podem iniciar o processo de capacitação (MANJUNATH & THERIEN, 2002).

As proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) são encontradas em um grande número de diferentes organismos, por exemplo, mamíferos, répteis e anfíbios (OLSON *et al.*, 2001; UDBY *et al.*, 2004; OSIPOV *et al.* 2005). Estas proteínas possuem uma única cadeia polipeptídica de 20 a 30 kDa e são caracterizadas por 16 resíduos conservados de cisteína interligados por pontes dissulfeto (YAMAZAKI & MORITA, 2004). Muitos membros da família CRISP têm sido identificados nos diferentes tecidos no trato reprodutor masculino, apresentando variados padrões de expressão (KRÄTZSCHMAR *et al.*, 1996; KEAH *et al.*, 2001; GIESE *et al.*, 2002). Atualmente, essas proteínas formam três principais grupos: CRISP-1 (ou AEG-1) glicoproteínas ácidas epididimárias (CUASNICU *et al.*, 2001); CRISP-2 (ou TPX-1) proteínas expressas principalmente no testículo (MIZUKI *et al.*, 1992);

e CRISP-3 (ou AEG-2) amplamente distribuídas e controladas por andrógenos (KRÄTZSCHMAR *et al.*, 1996). Várias funções têm sido relatadas para CRISPs do trato reprodutor masculino, dentre elas, ações no processo de fecundação, maturação espermática e adesão de células espermatozoides (MAEDA *et al.*, 1999).

Espermadesinas são glicoproteínas de baixa massa molecular (12 a 16 kDa), que estão presentes no plasma seminal, ou periféricamente associadas à superfície dos espermatozoides de animais domésticos tais como suínos, bovinos e eqüinos (CALVETE *et al.*, 1995b; REINERT *et al.*, 1996; TEDESCHI *et al.*, 2000). Além de sua importância potencial no processo de fecundação em mamíferos, essas proteínas estão agrupadas por apresentarem em comum uma estrutura formada por um único domínio CUB (ROMERO *et al.*, 1996). Esta nomenclatura provém das proteínas onde estes domínios foram primeiramente identificados (BORK & BERCKMANN, 1993): “C” de subcomponentes do complemento (complement subcomponents C1r/C1s), “U” de proteína do embrião do ouriço-do-mar (embryonic sea urchin protein, Uegf) e “B” de proteína 1 morfogenética do osso (Bone morphogenetic protein 1, Bmp1).

Espermadesinas são proteínas multifuncionais exibindo capacidade de ligação a carboidratos, inibidores de proteinase e fosfolípidos (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1998). Estas proteínas podem desempenhar diversas funções reprodutivas, atuando como fatores de decapacitação, como estabilizadoras do acrossoma (para proteger a membrana acrossomal e impedir a reação acrossômica prematura) ou, ainda, agir como lectinas ligadoras de glicoproteínas da zona pelúcida, durante a fecundação (DOSTÀLOVÀ *et al.*, 1994a; CALVETE *et al.*, 1994).

Já foram descritos os genes das cinco espermadesinas suínas (AWN, AQN-1, AQN-3, PSP-I e PSP-II), bem como da aSFP e da Z13 bovinas (HAASE *et al.*, 2005). No entanto, até o presente momento, embora as espermadesinas eqüina, ovina e caprina já tenham sido purificadas, os genes correspondentes ainda não foram identificados.

2. Espermadesinas suínas

O plasma seminal de suíno contém diferentes tipos de proteínas, como AQN, AWN, PSP e DQH, sendo as duas últimas, os tipos mais abundantes (JONÁKOVÁ *et al.*, 2007). As espermadesinas são secretadas principalmente pelo epidídimo e glândulas acessórias (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002; TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005b). No entanto, através de modernas técnicas de biologia molecular, transcritos de espermadesinas, antes

consideradas moléculas exclusivas do trato reprodutor masculino, já foram encontrados até no útero e junção útero-tubárica da fêmea suína (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002).

As espermedesinas suínas foram originalmente definidas como “proteínas ligadoras de polissulfatos”. Esta definição baseou-se no fato de que sua ligação à glicoproteínas da zona pelúcida do oócito podia ser inibida por polímeros sulfatados como fucoidan, heparina, sulfato de condroitina e polivinil sulfato (JONÁKOVÁ *et al.*, 1991; PARRY *et al.*, 1992).

A família das espermedesinas suínas é composta por cinco polipeptídeos denominados AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1998). Estes peptídeos possuem entre 110 e 133 resíduos de aminoácidos, unidos por duas pontes dissulfeto e apresentam cerca de 40 a 60% de similaridade em suas estruturas primárias (CALVETE *et al.*, 1995b).

Baseado em resultados de diferentes tipos de técnicas como espectrometria de massas, seqüenciamento de aminoácidos e eletroforese, têm sido descrita a existência de diferentes formas de uma mesma cadeia polipeptídica de espermedesina (JONÁKOVÁ *et al.*, 2007), como: a) a heterogeneidade das cadeias oligossacarídicas da espermedesina PSP-II (CALVETE *et al.*, 1995a; NIMTZ *et al.*, 1999) ou as formas glicosiladas e não glicosiladas de AQN (CALVETE *et al.*, 1993a) e AWN (CALVETE *et al.*, 1993b), em todos os casos oriundas de modificações pós-traducionais da cadeia polipeptídica; b) a existência de moléculas com N-terminal bloqueado em paralelo com o grupo livre, por exemplo em AWN-2 (SANZ *et al.*, 1992a,c; SANZ *et al.*, 1993; JONÁKOVÁ *et al.*, 1998); c) a ocorrência de forma com N-terminal truncado (SANZ *et al.*, 1993; JELINKOVÁ *et al.*, 2004).

As espermedesinas podem, ainda, ser encontradas nas suas formas agregadas ou isoladas (MANASKOVÁ *et al.*, 2000). Além da própria seqüência de aminoácidos, o padrão de glicosilação e o estado de agregação das espermedesinas também contribuem para o padrão de atividades biológicas (CALVETE *et al.*, 1993b; DOSTÁLOVÁ *et al.*, 1995a).

Diversos estudos têm procurado desvendar a origem celular das espermedesinas. Várias investigações na espécie suína têm indicado a vesícula seminal como a principal fonte produtora das espermedesinas, embora outros tecidos reprodutivos também produzam essas moléculas (KWOK *et al.*, 1993b; DOSTÁLOVÁ *et al.*, 1994b; SINOWATZ *et al.*, 1995). Abordagens investigativas através de RT-PCR, *Western blot* e imunohistoquímica têm identificado a presença das espermedesinas suínas em vesícula 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). Já a utilização de técnicas imunohistoquímicas também detectou AWN nesse tecido (SINOWATZ *et al.*, 1995). Estudos realizados com proteínas do líquido prostático demonstraram apenas pequenas quantidades de PSP-I e PSP-II, enquanto AQN e AWN não foram detectadas (MANASKOVÁ *et al.*, 2002). Nenhuma das espermedesinas foi, até então, encontrada nas glândulas bulbo-uretais suínas. Intrigantemente, transcritos da espermedesina AWN já foram encontrados no útero e na junção útero-tubárica da fêmea suína (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002). Tal achado desfaz considerações prévias de que as espermedesinas sejam moléculas exclusivas do trato reprodutor masculino.

2.1. PSP-I e PSP-II

As espermedesinas PSP-I e PSP-II (*Porcine Seminal plasma Proteins*) 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.*, 1993a).

As formas isoladas, PSP-I e PSP-II, apresentam capacidade de ligação à heparina. No entanto, a forma heterodimérica glicosilada apresenta-se na fração não-ligante à heparina. Adicionalmente 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.*, 1995b).

PSP-I e PSP-II, na forma heterodimérica, foram as primeiras espermedesinas a serem cristalizadas (ROMERO *et al.*, 1996) e terem a estrutura tridimensional determinada (FIGURA 1.1) na qual foi revelada a arquitetura do domínio CUB das espermedesinas. A estrutura cristalina é composta pelas subunidades PSP-I e PSP-II, unidas por interações não-covalentes. Os domínios CUB de cada monômero apresentam estrutura do tipo β -sandwich elipsoidal compacta, com presença de alguns resíduos de aminoácidos altamente conservados (quatro aromáticos e 15 a 17 hidrofóbicos) que definem a assinatura do domínio. Adicionalmente, asparagina 50 (N50) e tirosina 48 (Y48) de PSP-II, juntamente com glutamina 112 (Q112), apresentam-se como resíduos-chave no sítio putativo de ligação com a zona pelúcida (VARELA *et al.*, 1997).

A PSP-I é uma glicoproteína composta por 109 resíduos de aminoácidos, com massa molecular da ordem de 11 kDa (forma não-glicosilada). Esta espermedesina, apesar de uma única seqüência de aminoácidos, apresenta duas glicofomas, oriundas de diferentes

modificações pós-traducionais (CALVETE *et al.*, 1995b). Uma das glicofomas pode ser encontrada na fração ligante à heparina do plasma seminal (fração AQN-2), e contém resíduos de fucose, N-acetilglicosamina e manose (CALVETE *et al.*, 1993a). A outra glicofoma contém resíduos de galactosamina, galactose e ácido siálico e é preferencialmente recrutada por PSP-II para formar heterodímeros (CALVETE *et al.*, 1995a). Assim, o padrão de glicosilação pode determinar a capacidade de ligação da espermedesina e, conseqüentemente, sua função biológica (CALVETE *et al.*, 1993b).

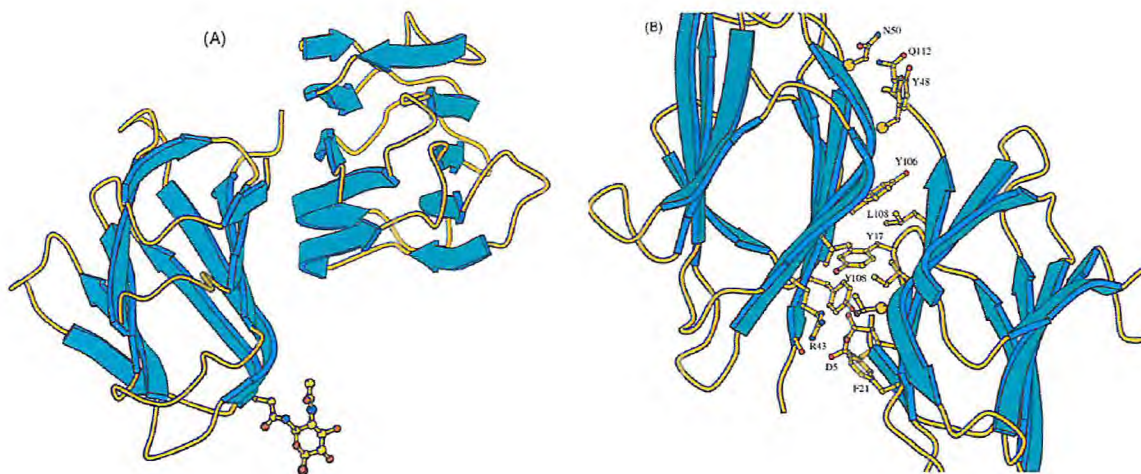


FIGURA 1.1. Representação tridimensional do heterodímero PSP-I/PSP-II mostrando o resíduo de N-acetilglicosamina ligado a asparagina 50 de PSP-I (A) e os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos flanqueados por resíduos polares, presentes na interface entre PSP-I e PSP-II (B). Adaptado de VARELA *et al.* (1997).

A espermedesina PSP-II, principal componente protéico do plasma seminal de suínos, é composta por 116 resíduos de aminoácidos e apresenta uma massa molecular (na forma não-glicosilada) de aproximadamente 12 kDa (CALVETE *et al.*, 1995a). Apresenta a capacidade de ligar-se a polissacarídeos sulfatados, tais como heparina (FIGURA 1.2A) e fucoidan, de forma específica e dose-dependente, e a oligossacarídeos contendo grupos manose-6-fosfato (FIGURA 1.2B). No entanto, apesar disso, o complexo PSP-I/PSP-II não apresenta essa afinidade, indicando que a dimerização bloqueia estericamente ou modifica os sítios envolvidos na interação proteína-carboidrato (SOLIS *et al.*, 1998). Adicionalmente, o monômero PSP-II apresenta um sítio putativo de ligação para glicoproteínas da zona pelúcida (CALVETE *et al.*, 1995a), conferindo essa capacidade a PSP-I/PSP-II. Tal fato poderia sugerir um papel destas espermedesinas na interação de gametas. Entretanto, o heterodímero

liga-se apenas fracamente à superfície do espermatozóide, sendo facilmente removido durante o processo de capacitação dos espermatozoides *in vitro* (DOSTÁLOVÁ *et al.*, 1994a).

Quanto às possíveis funções biológicas de PSP-I e PSP-II, evidências cumulativas apontam para um papel de modulador exógeno da atividade imune uterina (LESHIN *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1998) a qual pode assegurar o sucesso reprodutivo em suínos. Assim, PSP-I e PSP-II estimulam a atividade de linfócito *in vitro* (NIMTZ *et al.*, 1999), enquanto o heterodímero PSP-I/PSP-II induz o recrutamento de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos (ASSREUY *et al.*, 2002; ASSREUY *et al.*, 2003) e de suínos (RODRÍGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2005). O propósito dessas atividades pró-inflamatórias e imunestimulatórias possivelmente seja prevenir possíveis infecções do trato reprodutor baixo e prover um ambiente uterino livre de células para os embriões gerados (ASSREUY *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2005).

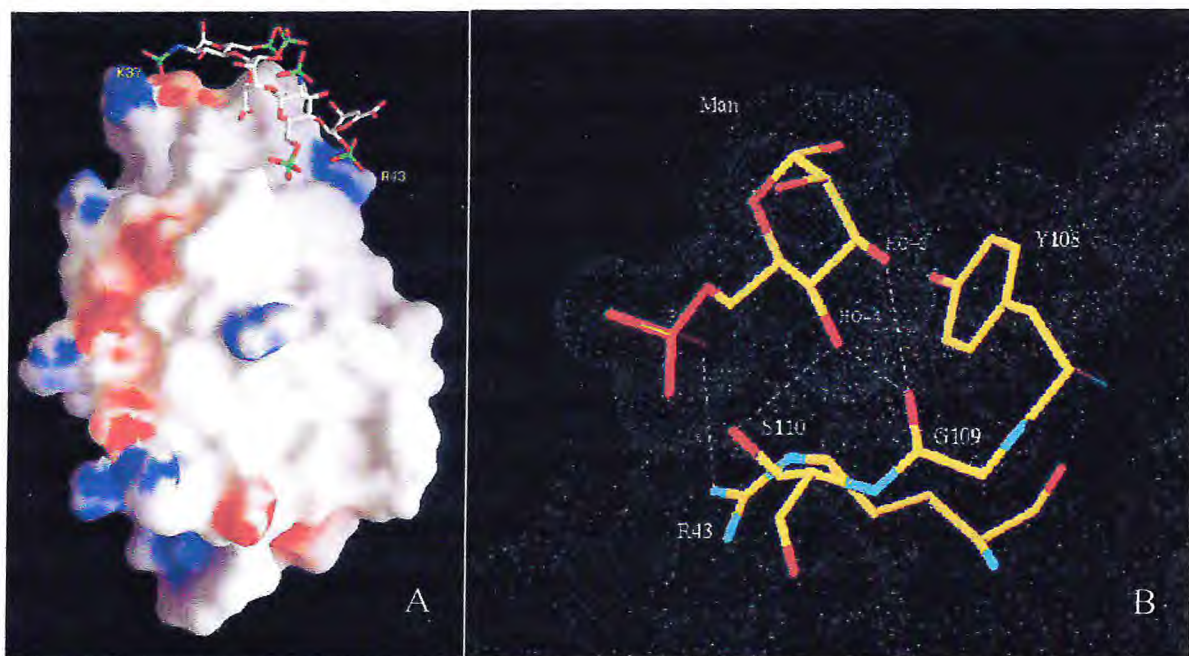


FIGURA 1.2. Representação tridimensional da molécula de PSP-II, apresentando o sítio de ligação ao tetrassacarídeo de heparina (A) e os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com manose-6-fosfato (B). Adaptado de SOLIS *et al.*, (1998).

Mais recentemente, essas espermadesinas têm mostrado exercer efeitos diversos na qualidade de espermatozoides 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 da viabilidade e da motilidade dos espermatozoides, (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 achados apontam para potencial utilização dessas proteínas como aditivo ao meio diluidor de sêmen, podendo incrementar os parâmetros espermáticos. Adicionalmente, não parece haver influência óbvia dessa espermadesina sobre a capacidade de fecundação *in vitro* dos espermatozoides 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 espermatozoides circundando os oócitos. Não se sabe se esses efeitos inibitórios são exercidos diretamente sobre os espermatozoides ou bloqueando os receptores ZP (glicoproteínas) na zona pelúcida do oócito (CABALLERO *et al.* 2005).

As duas seqüências nucleotídicas completas dos cDNAs de PSP-I e PSP-II foram obtidas a partir de biblioteca de vesícula seminal de suíno, e descritas por KWOK *et al.*, (1993a). A seqüência de 706 pb para o cDNA de PSP-I prediz um precursor de 133 resíduos de aminoácidos, dos quais 21 resíduos compõem o peptídeo-sinal e 112 resíduos a proteína madura. A seqüência de 686 pb para o cDNA de PSP-II prediz um precursor de 137 resíduos de aminoácidos, dos quais 21 resíduos formam o peptídeo-sinal e 116 resíduos a proteína secretada. As seqüências compartilham 61% de similaridade entre as regiões codificantes e 72% entre as regiões não-traduzidas da extremidade 3' (KWOK *et al.*, 1993a). Tal fato sugere uma evolução divergente entre os genes das espermadesinas (HAASE *et al.*, 2005).

2.2. AQN-1, AQN-3 e AWN

SANZ *et al.* (1991 e 1992a, b, c) identificaram e caracterizaram, estruturalmente e funcionalmente, várias proteínas, denominadas “espermadesinas”, com capacidade de ligação à glicoproteínas da zona pelúcida em suínos. A nomenclatura adotada para as espermadesinas AQN e AWN foi baseada nos três primeiros resíduos de aminoácidos das respectivas seqüências da região N-terminal: alanina (A), glutamina (Q), asparagina (N) e alanina (A), triptofano (W), asparagina (N); onde os números indicaram a posição de eluição destes peptídios em coluna de HPLC de fase reversa (JONÁKOVÁ *et al.*, 1991).

Inicialmente foram identificadas e nomeadas as espermedesinas AQN-1, AQN-2 e AQN-3 (JONÁKOVÁ *et al.*, 1991; SANZ *et al.*, 1991). Posteriormente foi descoberto que a fração AQN-2 tratava-se, na verdade, de uma mistura de PSP-I e uma isoforma glicosilada de AQN-3 (CALVETE *et al.*, 1993a). Posteriormente, foram descritas as isoformas AWN-1 e AWN-2, as quais apresentavam estruturas primárias idênticas, divergindo apenas pela presença de um resíduo de aminoácido acetilado bloqueando a região N-terminal de AWN-2 (SANZ *et al.*, 1992a).

O uso de técnicas de imunofluorescência indireta mostrou que espermedesinas AQN e AWN são sintetizadas em células epiteliais da vesícula seminal e se ligam à região acrossômica de espermatozóides no epidídimo durante a ejaculação (VESELSKÝ *et al.*, 1992; VESELSKÝ *et al.*, 1999). A AWN também pode ser sintetizada na *reti testis* e, então, transportada para o epidídimo, estando presente no espermatozóide epididimário em quantidade de 6 a 7 x 10⁶ moléculas/célula (DOSTÁLOVÀ *et al.*, 1994b), onde desempenham um papel importante na maturação deste (CALVETE *et al.*, 1994; SINOWATZ *et al.*, 1995). Assim, já foi descrito que as formas monoméricas e diméricas de AWN e AQN-3 são capazes de ligar-se a fosfolípidos da membrana plasmática do espermatozóide suíno (DOSTÁLOVÀ *et al.*, 1995b). Na espermedesina AWN, o sítio responsável por essa interação encontra-se entre os resíduos 6-12 e 104-108, e está disposto em localização oposta ao sítio de ligação a carboidrato (ENSSLIN *et al.*, 1995).

As formas não-glicosiladas dessas espermedesinas encontram-se acopladas à membrana espermática, sobre a região acrossômica (SANZ *et al.*, 1993; DOSTÁLOVÀ *et al.*, 1994a), podendo ligar-se a carboidratos como heparina, β-galactosídeos e a carboidratos da zona pelúcida (CALVETE *et al.*, 1995a; DOSTÁLOVÀ *et al.*, 1995a; CALVETE *et al.*, 1996). Adicionalmente, AWN já foi encontrada nos espermatozóides vistos *in vivo* ao longo do trato genital da fêmea, assim como naqueles ligados à zona pelúcida (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998). Tais achados indicam o papel dessas moléculas na interação entre os gametas (SANZ *et al.*, 1992a; VESELSKÝ *et al.*, 1999) e na formação do reservatório espermático (LIBERDA *et al.*, 2006) em suínos. O desempenho desta última função por AQN-1 parece ser realizado através da interação com o receptor SBG (*Sperm Binding Glycoprotein*) nas regiões do ístimo e ampola do oviduto da porca (PEREZ *et al.*, 2006). LIBERDA *et al.* (2006) relatam que proteínas ligantes a heparina (em especial AQN-1) podem habilitar os espermatozóides à ligação ao epitélio do oviduto, permitindo a formação do reservatório espermático. Essa interação foi inibida por manose, ácido hialurônico e

glicoproteínas sialiladas, mas não por polissacarídeos sulfatados, como heparina e sulfato de condroitina e por monossacarídeos.

A ligação de SAAIs (inibidores de acrosina associados à superfície do espermatozóide) com AQN-1 e AWN estabiliza o local de ligação à zona pelúcida nessas moléculas, durante a passagem pelo trato reprodutor da porca, ocorrendo dissociação por ocasião da interação entre os gametas (SANZ *et al.*, 1992c). Assim, através da interação com SAAIs, as espermadesinas AWN e AQN-1 podem participar no processo de capacitação espermática (JELÍNKOVÁ *et al.*, 2004; SANZ *et al.*, 1993).

Recentemente foi descrito que AQN-1 pode formar, em condições fisiológicas, um heterodímero com um inibidor de proteinase de 8 kDa do plasma seminal suíno (JELÍNKOVÁ *et al.*, 2003). Devido ao papel biológico desses inibidores na inativação de proteases liberadas prematuramente a partir de dano espermático (THIBAUT *et al.*, 1993), é possível que a interação espermadesina/SAAIs possa proteger os espermatozoides contra degradação proteolítica (JELÍNKOVÁ *et al.*, 2003).

As seqüências dos cDNAs das espermadesinas AWN, AQN-1 e AQN-3 foram recentemente descritas por EKHLASI-HUNDRIESER *et al.* (2002). A seqüência de aminoácidos deduzida a partir de cDNA para AQN-3 foi idêntica àquela do principal transcrito do fator de inibição da motilidade espermática (SPMI) da vesícula seminal de suíno (IWAMOTO *et al.*, 1995), indicando que SPMI representa a forma agregada de 50 kDa de AQN-3 (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002). Intrigantemente, a expressão de AWN também foi detectada no trato reprodutor feminino (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002).

3. Espermadesinas bovinas: SPADH-1 (aSFP) e SPADH-2 (Z13)

A espermadesina aSFP (*acidic Seminal Fluid Protein*) é um polipeptídeo não-glicosilado, com 12,9 kDa, purificado a partir do plasma seminal bovino (EINSPANIER *et al.*, 1991). A estrutura primária apresenta 114 resíduos de aminoácidos unidos por duas pontes dissulfeto intracadeia (EINSPANIER *et al.*, 1994).

No animal adulto, a aSFP é o principal componente do fluido seminal, sendo sua concentração na faixa de 1 a 7 mg/mL (EINSPANIER *et al.*, 1993). A aSFP é uma proteína expressa principalmente na vesícula seminal e ampola e em menor proporção no epidídimo (WEMPE *et al.*, 1992), não tendo sido detectada em nenhum outro tecido bovino (EINSPANIER *et al.*, 1991).

Assim como as espermedesinas PSP-I/PSP-II suínas, a aSFP bovina liga-se apenas frouxamente à superfície do espermatozóide presente no ejaculado, sendo quantitativamente liberada durante a capacitação *in vitro* (DOSTÁLOVÀ *et al.*, 1994b). 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, reduzindo a peroxidação lipídica (SCHÖNECK *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 cristalização (DIAS *et al.*, 1997), a estrutura tridimensional de aSFP foi determinada, sendo idêntica à das espermedesinas suínas PSP-I e PSP-II (FIGURA 1.3A). No entanto, algumas características exclusivas desta proteína foram demonstradas (ROMÃO *et al.*, 1997), o que pode explicar as diferentes propriedades biológicas apresentadas pelos membros da família das espermedesinas. Assim, por exemplo, a ponte dissulfeto existente entre Cys54 e Cys75 adota duas conformações alternativas (FIGURA 1.3B), com os resíduos desses aminoácidos variando entre a forma reduzida e a oxidada. Esse achado está em acordo com resultados de outros estudos apresentando três formas moleculares diferindo em seus pontos isoelétricos (EINSPANIER *et al.*, 1994). Adicionalmente, esse equilíbrio redox poderia potencialmente explicar o fato de aSFP poder reduzir a peroxidação lipídica dos espermatozóides (SCHÖNECK *et al.*, 1993).

SPADH-2 (ou Z13) é o mais recente membro da família das espermedesinas bovinas purificado a partir do plasma seminal. É um polipeptídeo não-glicosilado de 13 kDa, sem afinidade por heparina. Apresenta 116 resíduos de aminoácidos, os quais conferem 53% de similaridade com a aSFP. Apesar disso, a mais significativa diferença entre Z13 e as outras espermedesinas encontra-se na existência de um quinto resíduo de cisteína (C89) na primeira molécula (FIGURA 1.4). 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).

A caracterização do cDNA codificando aSFP identificou uma ORF da posição 7 a 411, seguida por dois códons de parada. A partir dessa seqüência nucleotídica, foi deduzido um peptídeo sinal de 20 resíduos e uma cadeia polipeptídica de 134 resíduos de aminoácidos, com massa molecular calculada em 12,922 kDa (WEMPE *et al.*, 1992).

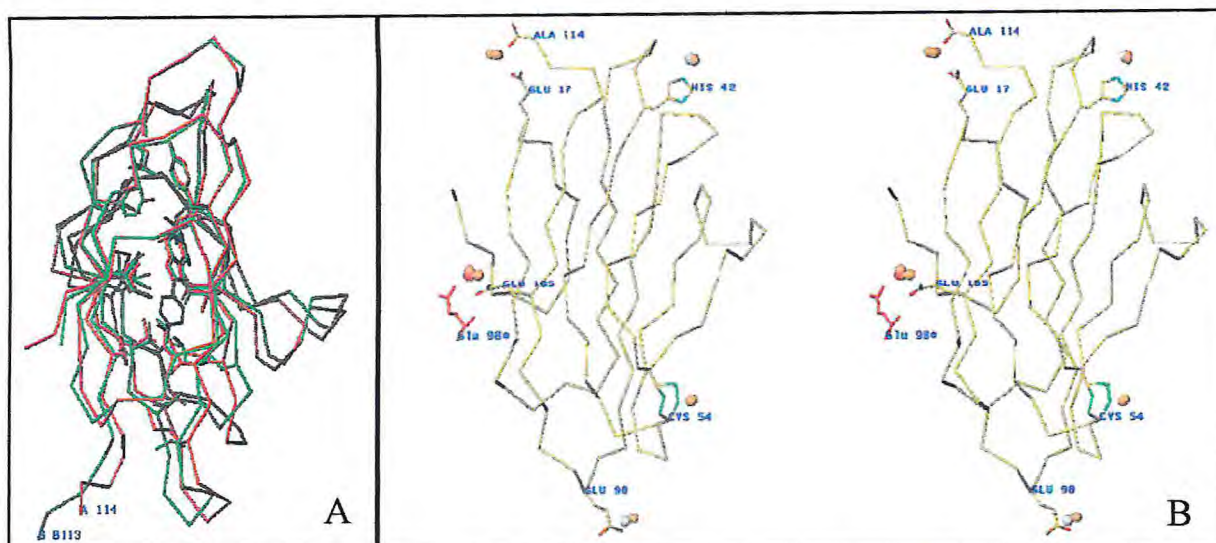


FIGURA 1.3. Estrutura molecular tridimensional de aSFP. (A) Sobreposição das cadeias carbônicas dos domínios CUB de aSFP (vermelho) e PSP-I (verde), mostrando o núcleo hidrofóbico conservado em ambas as estruturas. (B) Representação estérica dos locais de ligação a átomos pesados (esferas marrons), destacando os resíduos de aminoácidos envolvidos e as duas conformações possíveis da ponte dissulfeto entre Cys54-Cys75. Adaptado de ROMÃO *et al.* (1997).

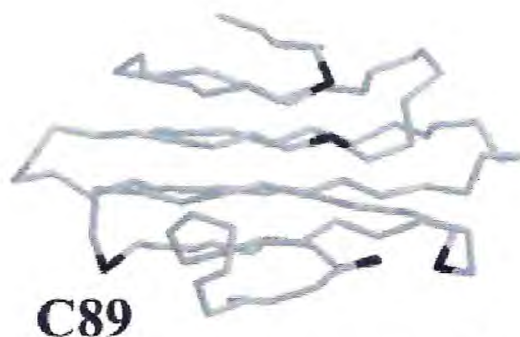


FIGURA 1.4. Modelo tridimensional proposto para Z13. Os resíduos de cisteína estão representados em preto. Em destaque encontra-se o quinto resíduo de cisteína (C89) peculiar a essa espermedesina. Adaptado de TEDESCHI *et al.* (2000).

4. Espermedesina eqüina: HSP-7 (SSP-7)

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

Em contraste com AWN suína, a HSP-7 foi primeiramente detectada em espermatogônias e, posteriormente, na *rete testis*, no epidídimo e na vesícula seminal. Em acordo com sua ampla distribuição celular, HSP-7 já foi detectada em alguns espermatozóides isolados do testículo. Durante a passagem através dos ductos epididimários, quantidades adicionais de HSP-7 associam-se ao segmento equatorial do espermatozóide (REINERT *et al.*, 1997; HOSHIBA & SINOWATZ, 1998).

Tanto a AWN suína como a HSP-7 apresentam a capacidade comum de ligar-se a carboidratos da zona pelúcida. Em função disso, essas espermadesinas podem desempenhar um importante papel como moléculas de adesão primária, nas etapas iniciais do processo de fecundação (TÖPFER-PETERSEN & CALVETE, 1996; TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005a).

5. Espermadesina ovina: RSP-15,5 kDa

BERGERON *et al.* (2005) apresentaram o isolamento e a caracterização das principais proteínas do plasma seminal de carneiro, denominadas RSPs (*Ram Seminal plasma Proteins*). Os autores descreveram uma proteína denominada RSP-15,5 kDa, que foi identificada como uma espermadesina pelo seqüenciamento do seu N-terminal. Incrivelmente, essa molécula é idêntica às espermadesinas suína AQN-1 e caprina BSFP (*Buck Seminal Fluid Protein*). A espermadesina RSP-15,5 kDa é a principal proteína do plasma seminal de carneiro (compondo cerca de 45% do peso total de proteínas). Adicionalmente essa molécula é capaz de ligar-se à heparina, no entanto não liga a lipoproteínas de baixa densidade do ovo de galinha.

6. Espermadesina caprina: BSFP

TEIXEIRA *et al.* (2002) isolaram uma proteína, denominada BSFP (*Buck Seminal Fluid Protein*), a partir do plasma seminal de caprinos, a qual foi estruturalmente caracterizada como a primeira espermadesina caprina. A mesma apresentou massa molecular de 12,591 kDa determinada por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Essa proteína apresentou seqüência de aminoácidos da região N-terminal semelhante às espermadesinas AQN-1 e AWN de suíno e HSP-7 de eqüino, e não apresentou capacidade de ligação a heparina (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

O baixo volume do plasma seminal de caprinos, bem como de outras espécies, apresenta-se como uma forte barreira para a obtenção e, conseqüentemente, para o aprofundamento dos estudos estruturais e funcionais envolvendo essa biomolécula. Adicionalmente, a BSFP, bem como as demais espermedesinas não apresentam qualquer atividade aglutinante (TEIXEIRA *et al.*, 2002; TICHA *et al.*, 1998), a qual poderia servir como ferramenta para acompanhamento da atividade específica no processo de purificação dessa lectina por métodos bioquímicos clássicos.

Os cDNAs de algumas espermedesinas foram clonados após a descrição das mesmas (WEMPE *et al.*, 1992; KWOK *et al.*, 1993a; EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002). Todavia, os genes das espermedesinas caprinas ainda são desconhecidos.

7. Referências bibliográficas

ASSREUY, 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 macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biol. Reprod.*, v.68, p.1836-1841, 2003.

BERGERON, A., VILLEMURE, M., LAZURE, C., MAJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.*, v.71, p.461-470, 2005.

BORK, P., BERCKMANN, G. The CUB domain: a widespread module in developmentally regulated proteins. *J. Mol. Biol.*, v.231, p.539-545, 1993.

CABALLERO, I., VAZQUEZ, J.M., GIL, M.A., CALVETE, J.J., ROCA, J., SANZ, L., PARRILLA, 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., 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., SOLÍS, D., SANZ, L., DIAZ-MAURIÑO, T., SCHÄFER, W., MANN, K., TÖPFER-PETERSEN, E. Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *Europ. J. Biochem.*, v. 218, p. 719-725, 1993a.

CALVETE, J.J., SANZ, L., DOSTÁLOVÁ, Z., TÖPFER-PETERSEN, E. Characterization of AWN-1 glycosylated isoforms helps define the zona pellucida and serine proteinase inhibitor-binding region on boar spermadhesins. *FEBS Lett.*, v. 334, p.37-40, 1993b.

CALVETE, J.J., SOLÍS, D., SANZ, L., DIAZ-MAURINO, T., TÖPFER-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 ligand binding. *Biol. Chem.*, v.375, p.667-673, 1994.

CALVETE, J.J., MANN, K., SCHAFFER, 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.*, v.365, p.179-182, 1995a.

CALVETE, J.J., SANZ, L., DOSTÁLOVÁ, Z., TÖPFER-PETERSEN, E. Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. *Fertilität*, v.11, p.35-40. 1995b.

CALVETE, J.J., CARRERA, E., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Biol. Chem.*, v.377, p.521-527, 1996.

CENTURIÓN, F., VÁZQUEZ, J.M., CALVETE, J.J., ROCA, J., SANZ, L., PARRILLA, I., 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.

CUASNICU, P.S., ELLERMAN, D.A., COHEN, D.J., BUSSO, D., MORGENFELD, M. M., DA ROS, V.G. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Arch. Med. Res.*, v.32, p.614-618, 2001.

DIAS, J.M., CARVALHO, A.L., KÖLLN, I., CALVETE, J.J., TÖPFER-PETERSEN, E., VARELA, P.F., ROMERO, A., URBANKE, C., ROMÃO, M.J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of aSFP, a bovine seminal plasma protein with a single CUB domain architecture. *Protein Sci.*, v.6, p.725-727, 1997.

DOSTÁLOVÁ, Z., CALVETE, J.J., SANZ, L., HETTEL, C., RIEDEL, D., SCHONECK, C., EINSPANIER, R., TOEPFER-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, 1994a.

DOSTÁLOVÁ, Z., CALVETE, J.J., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E. Quantitation of boar spermadhesin in accessory sex gland fluids and on surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochem. Biophys. Acta*, v.1200, p.48-54, 1994b.

DOSTÁLOVÁ, Z., CALVETE, J.J., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin AWN-1: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Europ. J. Biochem.*, v.230, p.239-336, 1995a.

DOSTÁLOVÁ, Z., CALVETE, J.J., TÖPFER-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 Seyler*, v.376, p.237-242, 1995b

ENSSLIN, M., CALVETE, J.J., THOLE, H.H., SIERRALTA, W.D., ADERMANN, K., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E. Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associate proteins bound to immobilized porcine zona pelúcida: mapping of the

phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN. *Biolog. Chem. Hoppe-Seyler*, v.376, p.733-738, 1995.

EINSPANIER, R., EINSPANIER, A., WENPE, F., SCHEIT, K-H. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem. Bioph. 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, I., CALVETE, J.J., TÖPFER-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., TÖPFER-PETERSEN, E. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol. Reprod. Develop.*, v.61, p.32-41, 2002.

EKHLASI-HUNDRIESER, M., SCHÄFER, B., KIRCHHOFF, C., HESS, O., BELLAIR, S., MÜLLER, P., TÖPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol. Reprod. Develop.*, v.70, p.45-57, 2005.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistical Database - 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 15 mai. 07.

GARCIA, E.M., VAZQUEZ, J.M., CALVETE, J.J., SANZ, L., CABALLERO, I.O., PARRILLA, 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 functionality. *J. Andrology*, v.27, p.434-443, 2006.

GIESE, A., JUDE, R., KUIPER, H., RAUDSEPP, T., PIUMI, F., SCHAMBONY, A., GUERIN, G., CHOWDHARY, B.P., DISTL, O., TÖPFER-PETERSEN, E., LEEB, T. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic

epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene*, v.299, p.101-109, 2002.

HAASE, B., SCHLÖTTERER, C., HUNDRIESER, M.E., KUIPER, H., DISTL, O., TÖPFER-PETERSEN, E., LEEB, T. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene*, v.352, p.20–29, 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.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal - 2004. Rio de Janeiro: IBGE, dez. 2005.

IWAMOTO, T., HIROAKI, H., FURUICHI, Y., WADA, K., SATOH, M., SATOH, M., OSADA, T., GAGNON, C. Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Lett.*, v.368, p.420-424, 1995.

JELINKOVÁ, P., MANASKOVÁ, P., TICHA, M., JONÁKOVÁ, V. Protease inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.32, p.99-107, 2003.

JELINKOVÁ, P., LIBERDA, J., MANASKOVÁ, P., RYSLAVA, H., JONÁKOVÁ, V., TICHA, M. Mannan-binding proteins from boar seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.*, v.62, p.167-182, 2004.

JONÁKOVÁ, V., SANZ, L., CALVETE, J.J., HENSCHEN, A., CECHOVÁ, D., TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of a zona pellucid-binding glycoprotein of boar spermatozoa. *FEBS*, v.280, p.183-186, 1991.

JONÁKOVÁ, V., KRAUS, M., VASELSKY, L., CECHOVA, D., BEZOUSKA, K., TICHA, M. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.*, v.114, p.25-34, 1998.

JONÁKOVÁ, V., MANÁSKOVÁ, P., TICHÁ, M. Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v.849, p.307-314, 2007.

KEAH, H.H., O'BRYAN, M.K., DE KRETZER, D.M., HEARN, M.T. Synthesis and application of peptide immunogens related to the sperm tail protein tpx-1, a member of the CRISP superfamily of proteins. *The J. Pep. Res.*, v.57, p.1-10, 2001.

KRÄTZSCHMAR, J., HAENDLER, B., EBERSPAECHER, U., ROOSTERMAN, D., DONNER, P., SCHLEUNING, W.D. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family - Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur. J. Biochem. / FEBS*, v.236, p.827-836, 1996.

KWOK, S.C., YANG, D., DAI, 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.

LESHIN, L.S., RAJ, S.M., SMITH, C.K., KWOK, S.C., KRAELING, R.R., LI, W.I. Immunostimulatory effects of pig seminal proteins on pig lymphocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.114, p.77-84, 1998.

LIBERDA, J., MANÁSKOVÁ, P., PRELOVSKÁ, L., TICHÁ, M., JONÁKOVÁ, V. Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *J. Reprod. Immunol.*, v.30, p.55-62, 2006.

MAEDA, T., NISHIDA, J., NAKANISHI, Y. Expression pattern, subcellular localization and structure-function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. *Develop. Growth Different.*, v.41, p.715-722, 1999.

MANASKOVÁ, P., LIBERDA, J., TICHA, M., JONÁKOVÁ, V. Aggregate and monomeric forms of protein in boar seminal plasma: characterization and binding properties. *Fol. Biol.*, v.46, p.143-151, 2000.

MANASKOVÁ, P., RYSLAVA, H., TICHA, M., JONÁKOVÁ, A. Characterization of proteins from boar prostate. *Am. J. Reproduc. Immunol.*, v.48, p.283-290, 2002

MANJUNATH, P., THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.*, v.53, p.109-119, 2002.

MIZUKI, N., SARAPATA, D.E., GARCIA-SANZ, J.A., KASAHARA, M. The mouse male germ cell-specific gene *Tpx-1*: molecular structure, mode of expression in spermatogenesis, and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm. Genome*, v.3, p.274-280, 1992.

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. *Europ. J. Biochem. / FEBS*, v.265, p.703-718, 1999.

OLSON, J.H., XIANG, X., ZIEGERT, T., KITTELSON, A., RAWLS, A., BIEBER, A. L., CHANDLER, D.E. Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.98, p.11205-11210, 2001.

OSIPOV, A.V., LEVASHOV, M.Y., TSETLIN, V.I., UTKIN, Y.N. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.328, p.177-182, 2005.

PARRY, R.V., BARKER, P.J., JONES, R. Characterization of low m_r zona pellucida binding proteins from boar spermatozoa and seminal plasma. *Mol. Reprod. Develop.*, v.33, p.108-115, 1992.

PEREZ, F.A., ROMA, S.M., CABADA, M.O. MARINI, P.E. Sperm binding glycoprotein is differentially present surrounding the lumen of isthmus and ampulla of the pig's oviduct. *Anat. Embryol.*, v.211, p.619-624, 2006.

REINERT, M., CALVETE, J.J., SANZ, L., MANN, K., TÖPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Europ. J. Biochem. / FEBS*. v.242, p.636-640, 1996.

REINERT, M., CALVETE, J.J., 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. *Andrologia*, v.29, p.179-186. 1997.

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. Develop.*, v.10, p.310-320, 1998.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H., SARAIVA, F., WALLGREN, M., TIENHAI, P., JOHANNISSON, A., VÁZQUEZ, J. M., MARTÍNEZ, E., ROCA, J., SANZ, L., CALVETE, J.J. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, v.63, p.514-535, 2005.

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

ROMERO, A., VARELA, P., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of boar seminal plasma spermadesin PSP-I/PSP-II, a heterodimer of two CUB domains. *FEBS Lett.*, v.382, p.15-17, 1996.

SANZ, L., CALVETE, J.J., MANN, K., SCHAFER, W., SCHMID, E.R., TÖPFER-PETERSEN, E. The amino acid sequence of AQN3, a carbohydrate-binding protein isolated from boar sperm. Location of disulphide bridges. *FEBS Lett.*, v.291, p.33-36, 1991.

SANZ, L., CALVETE, J.J., MANN, K., SCHAFER, W., SCHMID, E.R., AMSELGRUBER, W., SINOWATZ, F., EHRHARD, M., TOPFER-PETERSEN, E. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Lett.*, v.300, p.213-218, 1992a.

SANZ, L., CALVETE J.J., MANN, K., SHAFER, W., SCHMID, E.R., AMSELGRUBER, W., TÖPFER-PETERSEN, E. The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. *Eur. J. Biochem.*, v.205, p.645-652, 1992b.

SANZ, L., CALVETE, J.J., JONAKOVA, V., TOPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin AQN-1 and AWN are sperm-associated acrosin inhibitor acceptor protein. *FEBS Lett.*, v.30, p.63-66, 1992c.

SANZ, L., CALVETE, J.J., MANN, K., GABIUS, H-J., TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: A dual role for spermadhesin in fertilization. *Mol. Reprod. Develop.*, v.35, p.37-43, 1993.

SCHÄFER, B., VON HORSTEN, H.H., DACHEUX, J.L., HOLTZ, W., KIRCHHOFF, C. Cloning and characterization of boar epididymal secretory proteins by homology to the human. *Reprod. Dom. Anim.*, v.38, p.111-118, 2003.

SCHÖNECK, 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.

SINOWATZ, F., AMSELGRUBER, W., TÖPFER-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-II, a member of the spermadhesin protein family. *FEBS Lett.*, v.431, p.273-278, 1998.

TEIXEIRA, D.I.A., CAVADA, B.S., SAMPAIO A.H., HAVT, A., BLOCHJR., C., PRATES, M.V., MORENO, F.B.M.B., SANTOS, E.A., CRISÓSTOMO, F.S.M., FREITAS, V.J.F. Isolation and partial characterization of a protein from buck (*Capra hircus*), homologous to spermadhesins. *Prot. Pep. Lett.*, v.9, 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 isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gen. Mol. Res.*, v.5, p.79-87, 2006.

TEDESCHI, G., OUNGRE, E., MORTARINO, M., NEGRI, A., MAFFEO, G., RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Europ. J. Biochem. / FEBS*, v.267, p.6175-6179, 2000.

TICHA, M., KRAUS, M., CECHOVA, D., JONÁKOVÁ, V. Saccharide-binding properties of boar AQN spermadhesins and DQH sperm surface protein. *Fol. Biol.*, v.44, p.15-21, 1998.

THIBAUT, LEVASSEUR, M.C., HUNTER, R.H.F. *Reproduction in Mammals and Man*. Paris: Ellipses, 1993.

TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reprod. Update*, v.5, p.314-329, 1999.

TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlation of boar spermadhesins. *J. Reprod. Fertil.*, v.50, p.55-61, 1996.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., KIRCHHOFF, C., LEEB, T., SIEME, HARALD. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.159-170, 2005a.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., TSOLOVA, M., LEEB, T., KIRCHHOFF, C., MÜLLER, P. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia*, v.37, p.202-204, 2005b.

TÖPFER-PETERSEN, E., ROMERO, A., VARELA, P.F., EKHLASI-HUNDRIESER, M., DOSTÁLOVÁ, Z., SANZ, L., CALVETE, J.J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*. v.30, p.217-224, 1998.

UDBY, L., SORENSEN, O.E., PASS, J., JOHNSEN, A.H., BEHRENDT, N., BORREGAARD, N., KJELDTSEN, L. Cysteine-rich secretory protein 3 is a ligand of α_1 B-glycoprotein in human plasma. *Biochem.*, v.43, p.12877-12886, 2004.

VARELA, P., ROMERO, A., SANZ, L., ROMÃO, M.J., TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. The 2.4Å 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.

VESELSKÝ, L., JONÁKOVÁ, V., SANZ, M. L., TÖPFER-PETERSEN, E., CECHOVÁ, D. Binding of 15-kDa glycoprotein from spermatozoa of boars to surface of zona pellucida and cummulus oophorus cells. *J. Reprod. Fertil.*, v.96, p.593-602, 1992.

VESELSKÝ, L., PEKNICOVÁ, J., CECHOVÁ, D., KRAUS, M., GEUSSOVÁ, G., JONÁKOVÁ, V. Characterization of boar spermadhesin by monoclonal and polyclonal antibodies and their role in binding to oocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.42, p.187-197, 1999.

YAMAZAKI, Y., MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*, v.44, p.227-231, 2004.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E. Neill, J.D., Eds. The Physiology of Reproduction. 2nd Ed. New York, Raven Press, p.189-317, 1994.

YANG, W.C., KWOK, S.C.M., LESHIN, S., BOLLO, E., LI, W.I. Purified porcine seminal plasma protein enhances in vitro immune activities of porcine peripheral lymphocytes. *Biol. Reprod.*, v.59, p.202-207, 1998.

WEMPE, F., EINSPANIER, R., SCHEIT, K.H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 183, p.232-237, 1992.

***CAPÍTULO II – BODESINAS: CLONAGEM E
CARACTERIZAÇÃO DOS cDNAs***



1. Introdução

O plasma seminal, fluido no qual os espermatozoides de mamíferos estão suspensos no sêmen, é uma mistura complexa de secreções originárias do epidídimo e glândulas acessórias (THIBAUT & FOURNIER-DELPECH, 1993). A composição protéica do plasma seminal varia de espécie para espécie. Estes componentes apresentam importantes efeitos sobre a função espermática, influenciando na capacidade fecundante do espermatozoide e exercendo efeitos sobre a fisiologia do trato reprodutivo feminino (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005). Um importante grupo desses componentes são proteínas semelhantes às lectinas, denominadas espermadesinas.

Espermadesinas são um grupo de polipeptídeos de 12 a 16 kDa encontradas no plasma seminal e perifericamente associadas com a superfície do espermatozoide (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1998), as quais são capazes de interagir com alguns receptores contendo açúcar sobre a superfície celular. A capacidade de se ligar aos açúcares é uma atividade biológica característica das lectinas e das proteínas semelhantes às lectinas. Todas as lectinas animais contêm um domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) em sua seqüência de aminoácidos. Todavia, as espermadesinas diferem estruturalmente da maioria das lectinas. Elas apresentam um domínio protéico diferente denominado CUB (BORK & BERCKMANN, 1993), um módulo de 110 aminoácidos, o qual foi nomeado após análise estrutural das três proteínas nas quais o domínio CUB foi primeiramente identificado (*complement subcomponents - C1r/C1s*, *embryonic sea urchin protein - Uegf*, e *bone morphogenetic protein 1 - Bmp1*). Este domínio consiste de um sanduíche feito de duas folhas, cada uma contendo quatro estruturas anti-paralelas e uma paralela (ROMÃO *et al.*, 1997; ROMERO *et al.*, 1997; VARELA *et al.*, 1997).

As espermadesinas já foram descritas no varrão, garanhão, touro, carneiro e bode. Varrões possuem cinco espermadesinas designadas como AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II (CALVETE *et al.*, 1995; VARELA *et al.*, 1997). Outra espermadesina, homóloga à AWN, foi descrita no garanhão e denominada HSP-7, a qual se liga à superfície espermática no momento da ejaculação (REINERT *et al.*, 1997). Estudos no touro demonstraram a presença das espermadesinas aSFP, a qual parece ser um fator de crescimento com efeitos nas células ovarianas (WEMPE *et al.*, 1992), e Z13, a qual apresenta 50% de similaridade com PSP-I (TEDESCHI *et al.*, 2000). Recentemente, BERGERON *et al.* (2005) purificaram uma proteína de 15,5 kDa (RSP) a partir do

plasma seminal de carneiro, a qual foi identificada como espermedesina após seqüenciamento do N-terminal. Em dois estudos anteriores, nosso grupo descreveu a seqüência N-terminal de um membro da família das espermedesinas no plasma seminal de bode e a denominou primariamente de BSFP (buck seminal fluid protein). Esta proteína é similar à AWN, AQN-1 e HSP-7 (TEIXEIRA *et al.*, 2002, 2006).

Os cDNAs de algumas espermedesinas foram clonados após a descrição das mesmas (WEMPE *et al.*, 1992; KWOK *et al.*, 1993; EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002). Todavia, os genes das espermedesinas caprinas ainda são desconhecidos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi clonar e caracterizar os genes da espermedesina caprina e investigar seu perfil de expressão ao longo do trato genital masculino.

2. Material e métodos

2.1. Animal e obtenção dos tecidos: testículo e vesícula seminal

Um macho da espécie caprina (*Capra hircus*), sem raça definida (FIGURA 2.1) foi selecionado através de exame clínico-andrológico e de arcada dentária. Após constatação do bom estado sanitário, da presença de mais de uma muda dentária, e do desenvolvimento sexual compatível com a idade, o animal foi alojado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, na Universidade Estadual do Ceará. A dieta alimentar foi elaborada para permitir um bom desempenho reprodutivo, e consistiu de concentrado comercial (mínimo de 18% de proteína bruta) e feno de tifton (*Cynodon dactylum*) à vontade. Durante o período de um mês, foram realizadas duas colheitas semanais de sêmen, usando-se o método da vagina artificial, a qual estava acoplada a um tubo graduado (mL). Como manequim, foi utilizada uma cabra em estro artificial, obtido através de injeções intra-musculares semanais de cipionato de estradiol (ECP, Upjohn, São Paulo, Brasil). As amostras de sêmen foram submetidas à avaliação dos seguintes parâmetros físicos e microscópicos: aspecto, cor, volume, motilidade massal (variando de 0 a 5) e motilidade individual progressiva (de 0 a 100%). A última colheita de sêmen foi realizada cerca de três dias antes da cirurgia para obtenção dos tecidos.

No que se refere à ética e bem-estar animal, este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), através da resolução número 2449-CEPE. Além disso, o animal foi anestesiado

e sacrificado de acordo com as normas de bem-estar animal (VAN ZUTPHEN & VAN DER VALK, 2001). Os tecidos foram colhidos através de procedimento cirúrgico, seguindo sua localização anatômica (FIGURA 2.2; ASHDOWN & DONE, 2003). Os testículos foram removidos do saco escrotal e da túnica vaginal, liberados da túnica albugínea e submetidos a um corte sagital. Um *pool* de quatro amostras foi realizado, sendo duas obtidas de cada testículo: uma da região central, outra da região periférica do órgão. Ambas as vesículas seminais foram colhidas através de uma incisão sagital no lado esquerdo da região pélvica, dando acesso à face superior da uretra, na região de conexão com a bexiga urinária. Após colheita, os tecidos foram rapidamente estocados em nitrogênio líquido até isolamento do RNA total de cada amostra separadamente.



FIGURA 2.1. Exemplar de macho da espécie caprina (*Capra hircus*) sem raça definida.

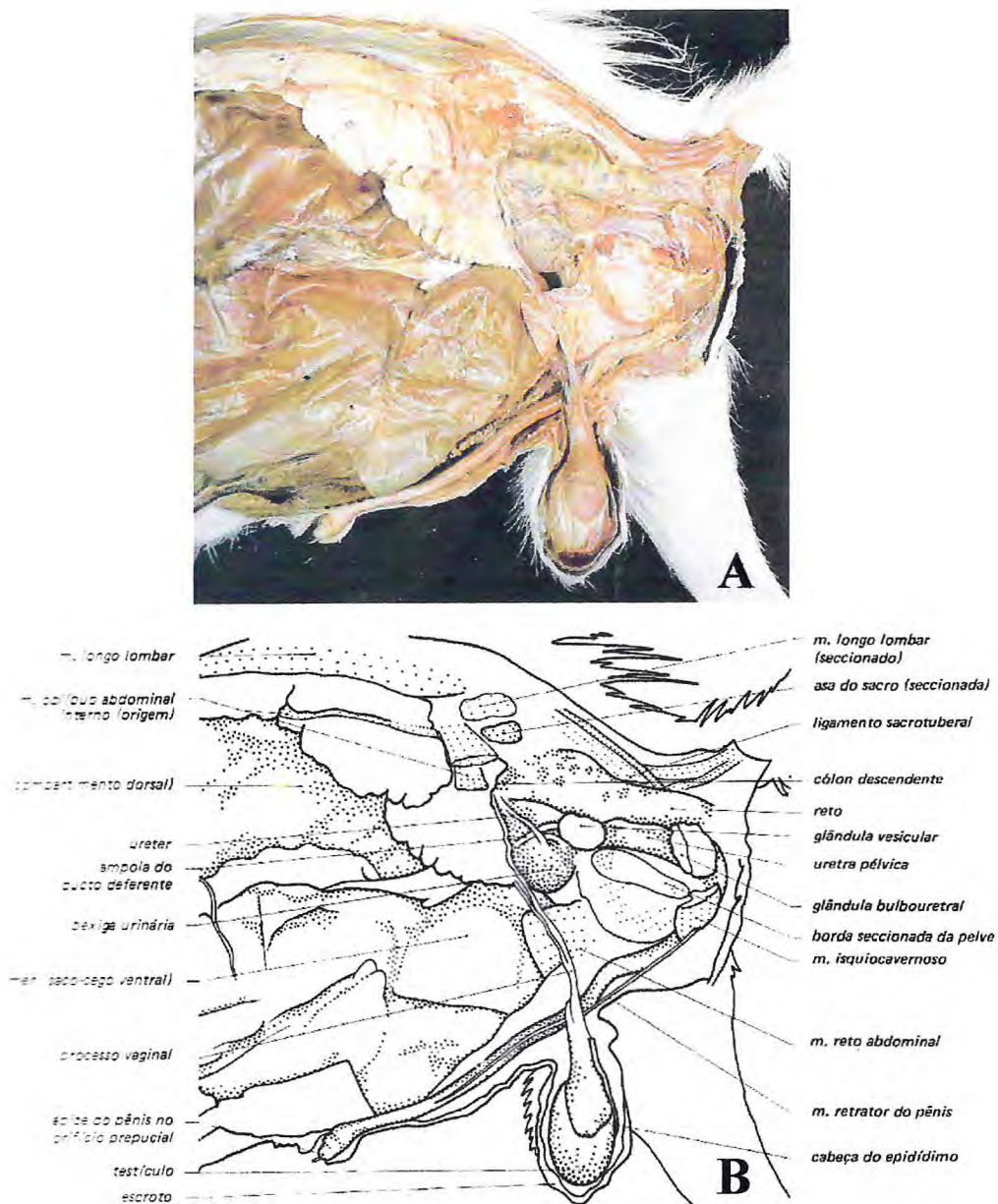


FIGURA 2.2. Aparelho reprodutor masculino na espécie caprina (*Capra hircus*). (A) Secção sagital longitudinal da região pélvica de um espécime. (B) Desenho esquemático apresentando a localização anatômica dos principais órgãos, glândulas acessórias e ductos. Fonte: ASHDOWN & DONE, 2003.

2.2. Isolamento do RNA total

Toda a vidraria e a água utilizadas nesta etapa foram previamente tratadas para remoção e/ou inativação das enzimas que degradam o RNA (RNases). A vidraria limpa foi submetida a tratamento por calor (150°C por 4 horas). A água ultrapura, obtida de

um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), foi tratada por 24 horas com 0,01% de DEPC (dietilpirocarbonato) e, em seguida, autoclavada.

O RNA total dos tecidos foi obtido pelo método do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Desta maneira, cada tecido foi pulverizado na presença de nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo. Para cada 10 mL de reagente Trizol, foram adicionados aproximadamente 2g de amostra pulverizada. Em seguida, o material foi homogeneizado usando um Potter-Elvehjem Tissue Grinder (Kontes-Fisher, Suwanee, USA). Após homogeneização, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado, contendo membranas celulares, polissacarídeos e DNA de alta massa molecular, foi descartado. A fase líquida foi transferida para um tubo limpo para a realização da separação de fases. Para isso, a mesma foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, 2 mL de clorofórmio foram adicionados, e, após agitação vigorosa, foi deixado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Cada amostra foi, então, centrifugada a 6500 x g por 30 minutos a 4°C, para separação em três camadas: uma vermelha (camada inferior), uma intermediária e uma aquosa clara (camada superior). Esta última foi, então, recuperada para um tubo limpo, para precipitação do RNA. Para isso, foram adicionados 5 mL de álcool isopropílico, seguindo-se uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente (25°C). O material foi, então, centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de RNA total foi submetido a uma lavagem utilizando 10 mL de solução de etanol a 75% e centrifugação a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O sedimento de RNA foi seco ao ar por 5 a 10 minutos e, em seguida, hidratado por 10 minutos a 55°C em 100 µL de água livre de RNase.

2.3. Isolamento do RNA mensageiro

O RNA mensageiro (RNAm) foi obtido do RNA total usando colunas cromatográficas de oligo(dT) celulose (Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante, com algumas modificações descritas a seguir. Após adição de 1,9 mL de tampão de ligação (Tris-HCl 10 mM - pH 7,5 - EDTA 1 mM, NaCl 300 mM, SDS 0,1%) à solução aquosa contendo o RNA total, uma alíquota de 10 µL foi removida e utilizada para cálculo do rendimento e da qualidade dos RNAs obtidos. Para isso, uma diluição de 10 vezes foi realizada e a absorbância a 260 e 280 nm foi mensurada em espectrofotômetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (GE

Healthcare, Piscataway, EUA). A concentração de RNA foi determinada usando a seguinte fórmula:

$$[\text{RNA}] = (\text{Abs}_{260} / 0,025) \times 10$$

Onde: [RNA] corresponde à concentração de RNA em $\mu\text{g/mL}$, Abs_{260} corresponde à absorbância mensurada a 260 nm, 0,025 é o fator de conversão relacionando a absorbância à concentração e 10 é o fator de diluição utilizado.

A qualidade do RNA obtido foi inferida pela razão ($R_{260/280}$) entre as absorbâncias mensuradas a 260 e 280 nm.

Em seguida, a solução contendo o RNA total foi aquecida a 70°C por 5 minutos e colocada imediatamente em gelo por 5 minutos. Uma alíquota de 1 mL dessa solução, contendo menos do que 20 mg de RNA, foi adicionada a 30 mg de resina de oligo(dT) celulose, previamente equilibrada com o mesmo tampão de ligação, e colocada sob agitação por 30 minutos. Em seguida o material foi transferido para colunas do tipo "spin" e centrifugado a $3000 \times g$ por 45 segundos. A resina foi, então, lavada três vezes com 100 μL do tampão de ligação, utilizando centrifugações de $3000 \times g$ por 45 segundos. A recuperação do mRNA foi realizada através de duas eluições. A primeira foi feita com 100 μL do tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM - pH 7,5 - EDTA 1 mM, SDS 0,1%) e centrifugação a $3000 \times g$ por 1 minuto. A segunda, com 100 μL de água ultrapura livre de RNase e centrifugação a $3000 \times g$ por 1 minuto. Ambas as alíquotas recuperadas foram submetidas a espectrofotometria a 260 e 280nm para cálculo do rendimento e da qualidade dos RNAs obtidos, como escrito anteriormente.

2.4. Amplificação rápida da extremidade 3' do cDNA (3'-RACE)

2.4.1. Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada através de reação de polimerização com transcrição reversa utilizando um adaptador-3' Oligo(dT)₁₈, denominado QT (TABELA 2.1), e a enzima transcriptase reversa do vírus Moloney da leucemia murina (M-MLV RT) fornecidos pela Promega (Madison, EUA). Inicialmente 0,6 μg de RNAm foram acrescidos de 1 μg de QT e aquecidos a 72°C por 5 minutos e, imediatamente esfriados a 4°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados: dATP, dCTP, dGTP e dTTP (até concentração final de 0,5 mM de cada dNTP), 40 U de inibidor de RNase e 50 U de M-

MLV-RT, além do tampão de reação fornecido pelo fabricante. O material foi incubado por 60 minutos a 37°C para síntese do cDNA e, posteriormente, a 70°C por 15 minutos, para inativação da enzima. O material assim obtido foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1% e revelação com brometo de etídio.

TABELA 2.1. Oligonucleotídeos universais utilizados para 3'-RACE, 5'-RACE e clonagem das espermedesinas de caprino (*Capra hircus*)

Nome	Seqüência nucleotídica
QT	5'-CAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC(T ₁₈)-3'
Q0	5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGA-3'
AAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'
AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAT-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

2.4.2. Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação

A amplificação da extremidade 3' do cDNA (3'RACE) foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados dois oligonucleotídeos senso específicos: SMD-SE1 (TABELA 2.2), desenhado com base em uma região conservada das espermedesinas de suíno (PSP-I, PSP-II, AQN-1, AQN-3 e AWN) e SMD-SE2, desenhado baseado na seqüência N-terminal da espermedesina de bode descrita previamente por TEIXEIRA *et al.* (2002). O oligonucleotídeo antisense foi complementar a QT, denominado Q0 (TABELA 2.1), fornecido pela Clontech (Mountain View, EUA). A reação de amplificação constou de: 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 200 mM de SMD-SE1 ou SMD-SE2, 200 mM de Q0, 0,05 U/μL de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 1 μL de solução contendo cDNA (molde) e água ultra-pura destilada e autoclavada para um volume final de 100 μL. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), através de uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e de 30 ciclos de: desnaturação a 95°C por

30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma etapa de extensão final a 72°C por 8 minutos. Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e revelação com brometo de etídio.

TABELA 2.2. Oligonucleotídeos específicos utilizados para 3'- RACE, 5'-RACE e clonagem das espermidinas de caprino (*Capra hircus*)

Nome	Seqüência nucleotídica
SMD-SE1	5'-CCTTGCTGCTCAGTACAGC-3'
SMD-SE2	5'-TGTGGGGGSGTCCWCAGA-3'
SMD-AS1	5'-TCAGGAGTAAGCAATCTTCCT-3'
SMD-AS2	5'-TCACTAAGCTKYTGGACGC-3'

S = C+G; W = A+T; K = T+G; Y = C+T.

2.4.3. Clonagem molecular da extremidade 3' do cDNA em bactéria

I-) Subclonagem em vetor plasmidial

A subclonagem dos produtos de PCR obtidos foi realizada em vetor plasmidial utilizando o sistema pGEM-T Easy (Promega, Madison, EUA), seguindo as indicações do fornecedor. Assim, 1 a 3 µL dos produtos de amplificação obtidos anteriormente (contendo cerca de 150 ng de DNA) foram acrescidos de 50 ng de pGEM-T Easy Vector, 3 U de T4 DNA ligase, tampão de ligação (Tris-HCl 60 mM - pH 7,8 - MgCl₂ 20 mM, DTT - ditioneitol – 20 mM, ATP - adenosina trifosfato – 2 mM e PEG - polietilenoglicol – 10%) e água ultrapura para um volume final de 10 µL. O material foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente (25°C) e por mais 15 horas (*overnight*) a 4°C. O produto de subclonagem foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* previamente tornadas competentes pelo método do cloreto de cálcio descrito a seguir.

II-) Preparação de células bacterianas competentes

Células bacterianas (*E. coli*, JM109, Promega, Madison, EUA) foram sensibilizadas através do método do cloreto de cálcio (AUSUBEL *et al.*, 2002). A solução de CaCl₂ utilizada nesta etapa foi constituída de: 60 mM de CaCl₂, 15% de

glicerol e 10 mM de PIPES (ácido 1,4-piperazinodietanosulfônico), pH 7,0. Assim, JM109 foi cultivada por cerca de 15 horas (*overnight*) a 37°C em placa contendo LB-ágar. Bactérias oriundas de uma única colônia foram inoculadas em 50 mL de caldo LB e novamente cultivadas *overnight* a 37°C. Um volume de 4 mL do cultivo foi transferido para 400 mL de caldo LB e crescido a 37°C. Alíquotas de 1 mL desse meio foram coletadas para medição da absorbância a 590 nm (OD). Quando a OD tornou-se igual a 0,375, o meio foi centrifugado a 1600 x g por 7 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi re-suspenso em 10 mL de solução de CaCl₂ a 4°C e centrifugado a 1100 x g por 5 minutos à mesma temperatura. Após descarte do sobrenadante, as células foram novamente re-suspensas em 10 mL de solução de CaCl₂ a 4°C, deixadas em repouso por 30 minutos e centrifugadas a 1100 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi re-suspenso em 2 mL de solução de CaCl₂ a 4°C.

III-) Transformação

Um volume de 50 µL da suspensão de células competentes foi acrescido de 1 a 3 µL do produto de subclonagem, gentilmente homogeneizado e incubado em gelo por 20 minutos. Em seguida, o material foi imerso em banho-maria a 42°C por 45 a 50 segundos e imediatamente colocado em gelo por mais 2 minutos. Posteriormente, 950 µL de meio LB foram adicionados e as bactérias foram cultivadas por uma hora e meia a 37°C, sob agitação.

O controle positivo do método foi obtido através de uma reação de transformação de bactérias competentes utilizando uma solução contendo plasmídios purificados e de concentração previamente estabelecida.

IV-) Seleção das células recombinantes

Alíquotas de 10, 25 e 50 µL das bactérias transformadas foram, então, plaqueadas em meio LB-ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosídeo) e 100 µM de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) todos fornecidos pela GE Healthcare (Piscataway, EUA).

Uma amostragem significativa das colônias positivas (coloração branca) foi adicionalmente selecionada por PCR (*PCR-colony*) utilizando um par de oligonucleotídeos flanqueadores do inserto (M13F/M13R ou T7/SP6, TABELA 2.1) supridos pela Clontech (Mountain View, EUA). A amplificação foi realizada através de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento a 45°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma etapa de extensão final a 72°C por 8 minutos. Os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% e revelação com brometo de etídio.

Para controle da eficiência dos métodos de produção de células competentes e de transformação, foi calculada a proporção entre o número de células transformadas produzidas na reação de controle positivo, descrita anteriormente, e a massa de DNA (μg) utilizada.

V-) Propagação dos clones e purificação dos plasmídeos

Os clones que apresentaram insertos com 600 a 700pb foram cultivados *overnight* a 37°C em 4 mL de caldo LB contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Os plasmídeos foram extraídos e purificados do cultivo bacteriano, utilizando o GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, Piscataway, EUA) de acordo com as indicações do fabricante. Assim, 2 mL do cultivo foram centrifugados a 1500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi re-suspensão em 200 μL de uma solução tampão contendo Tris-HCl a 100 mM (pH 7,5), EDTA a 10mM e RNase I a 400 $\mu\text{g/mL}$. Após agitação vigorosa, para total re-suspensão das células, foram adicionados 200 μL de uma solução contendo NaOH a 0,2 M e SDS a 1% (m/v), para lise celular. Depois de 10 a 15 inversões, foram adicionados 400 μL de uma solução de neutralização e precipitação contendo acetato de potássio e um agente caotrópico. Após 10 a 20 inversões, o material foi centrifugado a 12000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado para o interior de colunas do tipo “microspin” contendo matriz de fibra de vidro, incubado por 1 minuto e, então, centrifugado a 12000 x g por 30 segundos. O eluato foi descartado e a matriz foi lavada com 500 μL de uma solução tampão contendo Tris-HCl, EDTA e 80% de etanol, através de centrifugação a 12000 x

g por 2 minutos. A coluna foi transferida para um tubo de coleta do plasmídeo e eluída com tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1 mM, pH 8,0) ou água ultra-pura destilada e autoclavada, usando centrifugação a 12000 x g por 1 minuto. As análises de quantidade e qualidade do DNA obtido foram feitas por mensuração das absorbâncias a 260 e 280 nm utilizando espectrofotômetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (GE Healthcare, Piscataway, EUA).

2.4.4. Seqüenciamento de nucleotídeos

Os plasmídeos dos clones selecionados foram purificados, quantificados e, então, utilizados para seqüenciamento de nucleotídeos através do método de terminação em cadeia (Dye terminator chemistry) utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator kit (GE Healthcare, EUA). Cada clone foi seqüenciado duas vezes com ambos os oligonucleotídeos senso (M13F ou T7) e antisenso (M13R ou SP6), flanqueadores do inserto. Reações de 10 µL foram preparadas em placas de 96 poços, da seguinte maneira: 1 µL de oligonucleotídeo (M13F, M13R, T7 ou SP6, TABELA 2.1) a 5 µM, 4 µL de reagente de seqüenciamento premix, 100 ng de DNA (amostra de plasmídeo) contido em um volume máximo de 5µL e água ultra-pura destilada e autoclavada para completar o volume final. A placa foi selada, homogeneizada, colocada em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e submetida a 30 ciclos de: 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao término dos ciclos, o DNA foi precipitado pela adição de 1 µL de acetato de amônio a 7,5 M e 27,5 µL de etanol a 100%, seguido por centrifugação a 2500 x g por 1 hora. O sobrenadante foi removido por inversão e “*spin*” invertido a 300 x g por 40 a 50 segundos. Um volume de 100 µL de solução de etanol a 70% foi adicionado em cada poço e removido por inversão e “*spin*” invertido a 300 x g por 40 a 50 segundos. O DNA foi, então, re-suspenso e um volume de 10 µL de solução de formamida (“*loading solution*”) e submetido à eletroforese capilar no seqüenciador de nucleotídeos MegaBACE DNA Analysis System (GE Healthcare, EUA). Para isso, após a injeção da matriz de poliacrilamida, e equilíbrio com o tampão de corrida, as amostras foram injetadas a 1 kV por 30 segundos, e a corrida foi realizada a 7 kV por 90 minutos.

2.4.5. Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram analisadas utilizando o *software* FredFrap e uma seqüência consenso foi determinada para cada cDNA.

As buscas em bases de dados para genes relacionados foram conduzidas utilizando o *software* BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), além de outras ferramentas de bioinformática disponíveis na Internet, na página do National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools>), do European Bioinformatics Institute, EBI (<http://www.ebi.ac.uk/tools>) e do Swiss Institute of Bioinformatics, SIB (<http://www.expasy.ch/tools>).

2.5. Amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (5'-RACE)

2.5.1. Síntese da primeira fita de cDNA

Dois oligonucleotídeos antisense (SMD-AS1 e SMD-AS2) foram desenhados de forma complementar à extremidade 3' do cDNA da Bodesina. A síntese da primeira fita de cDNA e a amplificação da extremidade 5' do cDNA (5'-RACE) foram realizadas através de reação em cadeia da polimerase (FIGURA 2.3) utilizando o 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada através de reação de polimerização com transcrição reversa utilizando o oligonucleotídeo SMD-AS1 (TABELA 2.2), RNAm (cuja obtenção foi descrita anteriormente) e a transcriptase reversa SuperScript™ II RT (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Inicialmente 1 a 5 µg de RNAm foram acrescidos de 2,5 pmol de SMD-AS1 e aquecidos a 70°C por 10 minutos e, imediatamente esfriados em gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados: dATP, dCTP, dGTP e dTTP (até concentração final de 0,4 mM de cada dNTP), MgCl₂ (até concentração final de 2,5 mM) e DTT (até concentração final de 10 mM) além do tampão de reação. O material foi incubado por 1 minuto a 42°C, acrescido de 200 U de SuperScript™ II RT, e novamente incubado a 42°C, por 50 minutos, para síntese do cDNA. Posteriormente, o material foi submetido a 70°C por 15 minutos, acrescido de RNase, incubado por mais 30 minutos a 37°C e, então, colocado em gelo. O produto assim obtido foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1% e revelação com brometo de etídio.

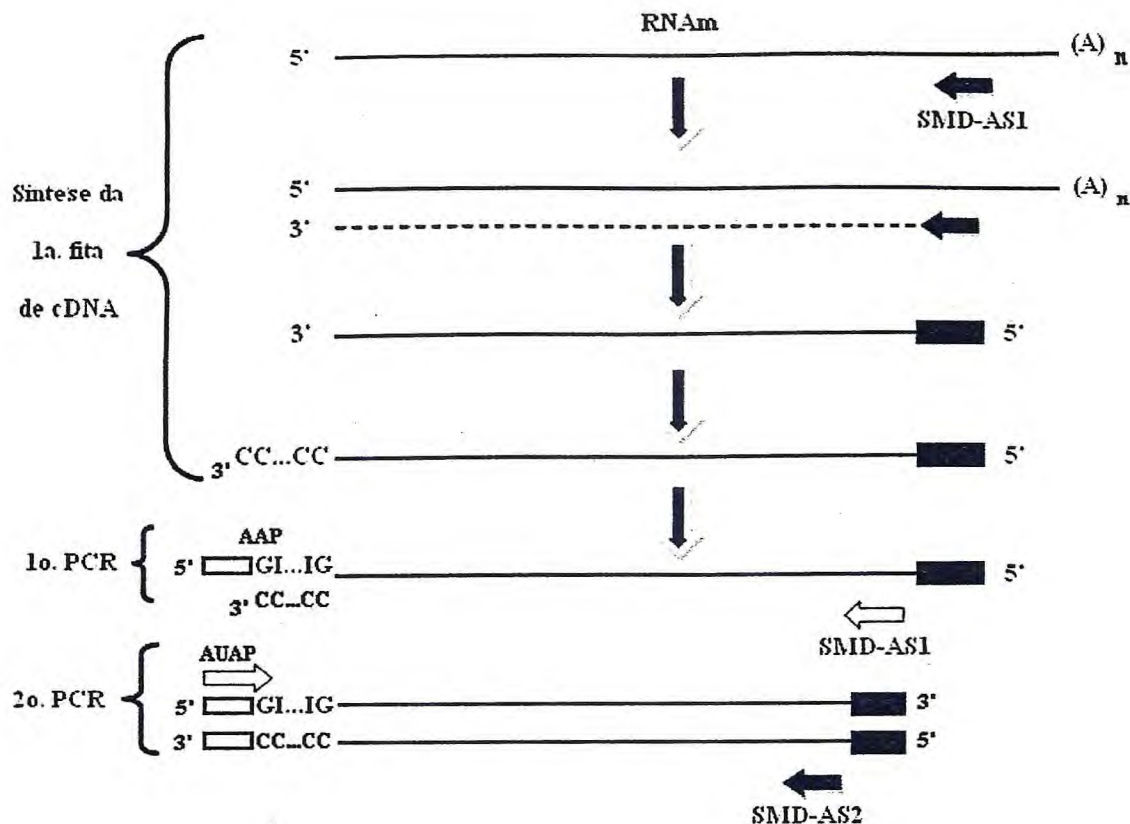


FIGURA 2.3. Representação esquemática da estratégia experimental para amplificação rápida da extremidade 5' (5'-RACE) do mRNA da espermedesina caprina. SMD-AS1 e SMD-AS2 = oligonucleotídeos antisense específicos complementares à extremidade 3' do mRNA da espermedesina caprina. AAP e AUAP = oligonucleotídeos universais fornecidos no Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

2.5.2. Purificação do cDNA fita simples

Ao cDNA produzido foram acrescentados 120 μ L de solução de iodeto de sódio (NaI) a 6 M à temperatura ambiente (25°C). A solução foi transferida para colunas contendo membranas à base de sílica (*S.N.A.P. columns*) e, então, centrifugada a 13.000 x g por 20 segundos. Em seguida foram realizadas três lavagens com 400 μ L de tampão de lavagem a 4°C e centrifugações a 13.000 x g por 20 segundos. Adicionalmente foram feitas mais duas lavagens com etanol a 70% e centrifugações a 13.000 x g por 20 segundos. A eluição do cDNA foi realizada com 50 mL de água ultra-pura destilada e autoclavada pré-aquecida a 65°C e centrifugação a 13.000 x g por 20 segundos.

2.5.3. Construção da cauda homopolimérica do cDNA

Após purificação, uma cauda homopolimérica, poli(dC), foi sintetizada na extremidade 3' do cDNA, através da ação da enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase). Para isso a reação constou de: 0,2 mM de dCTP, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 25 mM de KCl e 10 µL de solução contendo cDNA purificado e água ultra-pura destilada e autoclavada para um volume final de 24 µL. Após incubação a 94°C por 2 a 3 minutos, o material foi colocado em gelo por 1 minuto e, em seguida, acrescido de 1 µL da enzima TdT. A reação foi realizada a 37°C por 10 minutos e a inativação da enzima foi obtida por aquecimento a 65°C por mais 10 minutos.

2.5.4. Amplificação: 1°. PCR

A extremidade 5' foi inicialmente amplificada utilizando cDNA fita simples com cauda poli(dC), SMD-AS1 e o oligonucleotídeo AAP, Abridged Anchor Primer (TABELA 2.1). Para isso a reação de amplificação constou de: 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 200 mM de SMD-AS1, 200 mM de AAP, 0,05 U/µL de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 1 µL de solução contendo cDNA e água ultra-pura destilada e autoclavada para um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), através de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 1 a 2 minutos e de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minutos, além de uma etapa de extensão final a 72°C por 6 minutos. Os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% e revelação com brometo de etídio.

2.5.5. Amplificação: 2°. PCR (*Nested amplification*)

O produto de PCR obtido anteriormente foi re-amplificado utilizando SMD-AS2 (TABELA 2) e o oligonucleotídeo AUAP (Abridged Universal Ampification Primer, TABELA 2.1). Para isso a reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), e constou de: 2 mM de MgCl₂, 0,2

mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 200 mM de SMD-SE2, 200 mM de AUAP, 0,05 U/ μ L de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 1 μ L de solução contendo o produto do 1^o. PCR diluído 10 a 50 vezes e água ultra-pura destilada e autoclavada para um volume final de 50 μ L. A amplificação foi realizada através de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 1 a 2 minutos e de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minutos, além de uma etapa de extensão final a 72°C por 6 minutos. Os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% e revelação com brometo de etídio.

2.5.6. Clonagem molecular da extremidade 5' do cDNA em bactéria, seqüenciamento de nucleotídeos e análise das seqüências

As etapas de subclonagem em vetor plasmidial, preparação de células bacterianas competentes, transformação, seleção das células recombinantes, propagação dos clones, purificação dos plasmídeos, seqüenciamento de nucleotídeos e análise das seqüências por bioinformática foram realizadas de maneira semelhante àquela descrita para a extremidade 3' do cDNA.

3. Resultados

3.1. Animais, tecidos, RNA total, RNA mensageiro e cDNA

O caprino selecionado para obtenção dos tecidos apresentava boas condições sanitárias e uma muda dentária. As amostras de sêmen colhidas apresentaram os parâmetros físicos (aspecto, cor e volume) dentro do considerado fisiológico para a espécie. Já os parâmetros microscópicos, ou seja, motilidade massal e motilidade individual progressiva, foram sempre superiores a 3,0 e 70%, respectivamente.

Valores de rendimento e de qualidade do RNA total obtido a partir de cerca de 2g de vesícula seminal e 2g de testículo estão apresentados na TABELA 2.3. No que diz respeito a RNA mensageiro, foram obtidos 0,95 μ g para vesícula seminal e 1,3 μ g para testículo a partir de cada 100 μ g de RNA total aplicados na resina de oligo(dT) celulose (TABELA 2.4).

TABELA 2.3. Parâmetros qualitativos e quantitativos mensurados no processo de purificação de RNA total a partir de vesícula seminal e testículo de caprino

Parâmetros	Tecido	
	Vesícula Seminal	Testículo
R _{260/280}	1,83	2,05
Concentração (µg/mL)	759,20	704,00
Massa de RNA (µg)	1518,40	1408,00
Rendimento de RNA do tecido (µg/mg)	0,76	0,70

TABELA 2.4. Parâmetros qualitativos e quantitativos mensurados no processo de purificação de RNA mensageiro a partir de vesícula seminal e testículo de caprino

Parâmetros	Tecido	
	Vesícula Seminal	Testículo
Massa de RNA total aplicada na coluna (µg)	759,20	704,00
1ª. Eluição		
R _{260/280}	1,85	1,45
Concentração (µg/mL)	29,60	23,20
Massa de RNA (µg)	2,96	2,32
2ª. Eluição		
R _{260/280}	2,21	1,65
Concentração (µg/mL)	42,40	68,80
Massa de RNA (µg)	4,24	6,88
Rendimento final de mRNA (µg)	7,20	9,20

A transcrição reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), usando um protocolo com adaptador QT, permitiu o isolamento de moléculas de cDNA íntegras (FIGURA 2.4).

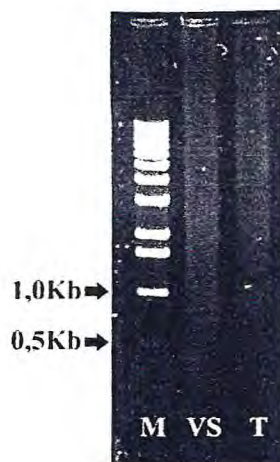


FIGURA 2.4. Eletroforese em gel de agarose a 1% do cDNA total de vesícula seminal (VS) e de testículo (T) de caprino (*Capra hircus*). M = marcador de massa molecular.

3.2. Amplificação e clonagem da extremidade 3' do cDNA

As reações de amplificação rápida da extremidade 3' do cDNA (3'-RACE) com Q0 e SMD-SE1 não produziram *amplicons* visíveis em gel de agarose a 1%, tanto com cDNA de vesícula seminal, quanto com testículo (dados não mostrados). No entanto, utilizando os oligonucleotídeos Q0 e SMD-SE2, foi possível detectar uma banda simples, com aproximadamente 700 pares de base (pb), em vesícula seminal (FIGURA 2.5). Neste caso, nenhum amplicon foi visível no produto do PCR no qual o cDNA de testículo serviu de molde.

A clonagem dos produtos de 3'-RACE de vesícula seminal produziu 40 clones bacterianos recombinantes, selecionados com antibiótico, X-Gal/IPTG e por *PCR colony* utilizando os oligonucleotídeos SP6 e T7, flanqueadores do inserto (FIGURA 2.6). A análise da sequência de nucleotídeos de 33 clones recombinantes revelou três insertos correspondentes a espermedesinas (FIGURA 2.7) denominadas Bodesina-1 (Bdh-1), Bodesina-2 (Bdh-2) e Bodesina-3 (Bdh-3). Todos os três clones apresentaram insertos variando de 606 a 608pb de comprimento, compreendendo uma janela de leitura (ORF, *open read frame*) da posição 1 até a 315, terminada por dois codons de parada da tradução (TAGTGA). A região codificadora foi seguida de aproximadamente 259nt de região não-transcrita (3'-UTR, *untranslated region*). Um sinal putativo de poliadenilação (AATAAA), situada nas posições 579, 578 e 577, para Bdh-1, -2 e -3, respectivamente, estava cerca de 13nt amontante (*upstream*) da cauda poli(A).

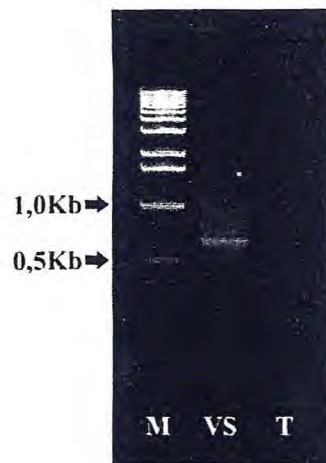


FIGURA 2.5. Amplificação da extremidade 3' do cDNA de vesícula seminal (VS) e de testículo (T) de caprino (*Capra hircus*) utilizando os oligonucleotídeos Q0 e SMD-SE2. Os *amplicons* em VS são os genes das espermadésinas caprinas (Bodesinas). M = marcador de massa molecular.



FIGURA 2.6. Seleção de clones da extremidade 3' do cDNA de espermadésina caprina por *PCR colony*. Gel representativo de análise eletroforética dos produtos de PCR obtidos por amplificação utilizando os oligonucleotídeos SP6 e T7. 1 a 13 = numeração das amostras; M = marcador de massa molecular.

>Bdh-1
 TGTGGGGGGTCTCAGAGACTTCTCTGGGAGGATCTCCAGCAGTTTCTCATGGGGGCCAAAGTGTACCTGGACCATCCTCTTGAAGAGCGGGTTATACAG
 TTGTACTGACAATTCCATTTCTCAGCCTCAACTGTAATGAAGAGGATGTGGAAATCATAGACGGGCTGCCAGACAGTACTACATTTGGGGGGCTCTGTTC
 AGGGGGACCCCTGGTGTAAATCTTCTTCCAATGTCATGACCGTGAAATACTACAGAAGTTCCAACCAGCCAGTATCTCCTTTTGATATATTTTACTAC
 GAGCGTCCAC**AGCTTAGTGAT**CGTGCTCACACCTAAGAGTGGACAAGTGTGGCCGATGAAAAACAATCTTCCTGGAAGACTCTTCTGGAACCAGCTGACC
 ACGAGGAGGGACACATCTTGGTCACTGTCTGATCACACCTGCCCATCCCATCCCGTCTCCTCCATTCCTTTCCAGCCTTCTGTCTCTTCCCTGCAAAGGA
 AGATTGCTTACTCCTGAGTGTTGATACTTGGCCGGTCTTGGGTTTCGGTCATTCGGCTTGTCTTTATAATCATTTTGAATAAAGTCTCTTTACCTGAAA
 AAAAAAA

>Bdh-2
 TGTGGGGGGTCTCAGAGACTTCTCTGGGAGGATCTCCAGCAGTTTCTCATGGGGGCCAAAGTGTACCTGGACCATCCTCTTGAAGAGCGGGTTATACAG
 TTGTACTGACGATTCCATTTCTCAGCCTCAACTGTAATGAAGAGGATGTGGAAATCATAGACGGGCTGCCAGACAGTACTACATTTGGGGGGTTCTGTTC
 AGGGGGACCCCTGGTGTAAATCTTCTTCCAATGTCATGACCGTGAAATACTACAGGAGTTCCAACCAGCCAGTATCTCCTTTTGATATATTTTACTAC
 GAGCGTCCAT**AGCTTAGTGAT**CGTGCTCACACCTAAGAGTGGACAAGTGTGGCCGATGAAAAACAATCTTCCTGGAAGACTCTTCTGGAACCAGCTGACC
 ACGAGGAGGGACACATCTTGGTCACTGTCTGATCACACCTGCCCATCCCATCCCGTCTCCTCCATTCCTTTCCAGCCTTCTGTCTCTTCCCTGCAAAGGA
 AGATTGCTTACTCCTGAGTGTTGATACTTGGCCGGTCTTGGGTTTCGGTCATTCGGCTTGTCTTTATAATCATTTTGAATAAAGTCTCTTTACCTGAAA
 AAAAAAA

>Bdh-3
 TGTGGGGGGTCTCAGAGACTTCTCTGGGAGGATCTCCAGCAGTTTCTCATGGGGGCCAAAGTGTACCTGGACCATCCTCTTGAAGAGCGGGTTATACAG
 TTGTACTGACGATTCCATTTCTCAGCCTCAACTGTAATGAAGAGGATGTGGAAATCATAGACGGGCTGCCGGACAGTACTACATTTGGGGGGTTCTGTTC
 AGGGGGACCCCTGGTGTAAATCTTCTTCCAATGTCATGACCGTGAAATACTACAGAAGTTCCAACCAGCCAGTATCTCCTTTTGATATATTTTACTAC
 GAGCGTCCAC**AGCTTAGTGAT**CGTGCTCACACCTAAGAGTGGACAAGTGTGGCCGATGAAAAACAATCTTCCTGGAAGACTCTTCTGGAACCAGCTGACC
 ACGAGGAGGGACACATCTTGGTCACTGTCTGATCACACCTGCCCATCCCATCCCGTCTCCTCCATTCCTTTCCAGCCTTCTGTCTCTTCCCTGCAAAGGA
 AGATTGCTTACTCCTGAGTGTTGATACTTGGCCGGTCTTGGGTTTCGGTCATTCGGCTTGTCTTTATAATCATTTTGAATAAAGTCTCTTTACCTGAAA
 AAAAAAA

FIGURA 2.7. Seqüência de nucleotídeos dos cDNAs codificando três espermadesinas caprinas (Bodesinas). Bdh-1 = Bodesina-1; Bdh-2 = Bodesina-2; Bdh-3 = Bodesina-3. Letras em **negrito** = nucleotídeos que podem codificar para resíduos de aminoácidos diferentes entre as três isoformas; Letras com sublinhamento simples = região para o oligonucleotídeo senso específico SMD-SE2 usado para 3'-RACE; Letra com sublinhamento duplo = seqüência nucleotídica para término de tradução (codons de parada); Letras em *itálico* = seqüência nucleotídica para sinal de poliadenilação.

3.3. Amplificação e clonagem da extremidade 5' do cDNA

A primeira reação de amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (1º. PCR do 5'-RACE) com SMD-AS1 e AAP gerou *amplicons* com cerca de 650pb (FIGURA 2.8). Já na segunda reação de amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (2º. PCR do 5'-RACE) utilizando os oligonucleotídeos SMD-AS2 e AUAP foi possível detectar uma banda simples, com aproximadamente 500pb (FIGURA 2.9).

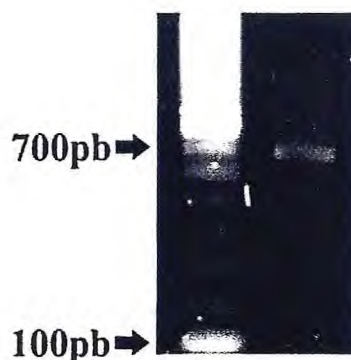


FIGURA 2.8. Amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (5'-RACE) de vesícula seminal de caprino (*Capra hircus*) utilizando os oligonucleotídeos SMD-AS1 e AAP. Os *amplicons* em são os genes das espermadesinas caprinas (Bodesinas). M = marcador de massa molecular.

A clonagem dos produtos do 2º. PCR do 5'-RACE permitiu a obtenção de 33 clones recombinantes selecionados por cultivo com antibiótico, por X-Gal/IPTG e por *PCR colony* utilizando os oligonucleotídeos M13R e M13F, flanqueadores do inserto (FIGURA 2.10). A análise da seqüência de nucleotídeos de seis clones recombinantes revelou um inserto correspondente a uma espermadesina (FIGURA 2.11) denominada Bodesina-4 (Bdh-4). O clone apresentou um inserto com 477pb de comprimento, compreendendo uma ORF de 408 nt de comprimento (da posição 70 até a 477), iniciada por uma região putativa codificadora do peptídeo sinal (situada entre 70 e 132nt) e terminada por dois codons de parada (TAGTGA). Uma região não-transcrita (5'-UTR, *untranslated region*), com aproximadamente 69nt de comprimento, estava situada amontante (*upstream*) da região da janela de leitura. A clonagem da extremidade 5' do cDNA permitiu, ainda, a identificação de uma região codificadora de 24 nt (situada imediatamente ajusante à região codificadora do peptídeo sinal), adicionais àqueles previamente conhecidos a partir da clonagem da extremidade 3'.

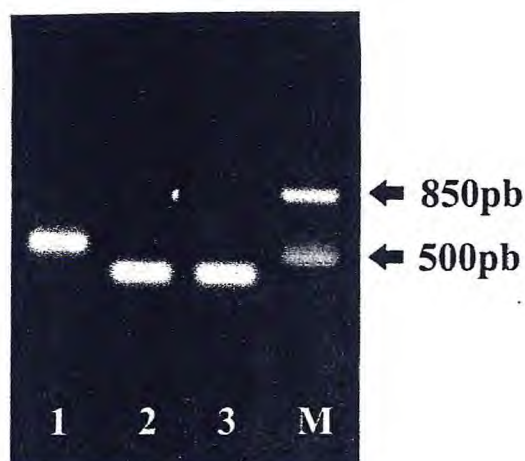


FIGURA 2.9. Amplificação rápida da extremidade 5' do cDNA (5'-RACE) de vesícula seminal de caprino (*Capra hircus*) utilizando os oligonucleotídeos SMD-AS2 e AUAP. Os *amplicons* produzidos são os genes das espermadesinas caprinas (Bodesinas). 1 = 1º. PCR utilizando cDNA de fitas simples como molde; 2 = PCR utilizando cDNA de fitas simples como molde e os oligonucleotídeos SMD-SE2 e SMD-AS2; 3 = PCR utilizando clone de Bdh-2 com molde e os oligonucleotídeos SMD-SE2 e SMD-AS2; M = marcador de massa molecular.

3.4. Análise das seqüências nucleotídicas

Após amplificação, clonagem e seqüenciamento das extremidades 3' e 5' dos cDNAs das bodesinas, a análise das seqüências em conjunto permitiu inferir que o mRNA das bodesinas compreende uma ORF de 405 nt (da base 70 até a 474) incluindo o códon de parada (FIGURA 2.12). Particularmente, todos os quatro cDNAs foram terminados por dois codons de parada consecutivos (TAGTGA). A região 5' não-traduzida (5'-UTR) é de aproximadamente 69nt de comprimento (TABELA 2.5) seguida por uma região codificadora de peptídeo sinal da base 70 até 132 (FIGURA 2.11). A região 3' não-traduzida (3'-UTR) é de aproximadamente, 278 nt de comprimento e contém um sinal de poliadenilação (AATAAA) que esta apenas 13 nt amontante (*upstream*) da cauda poli(A).

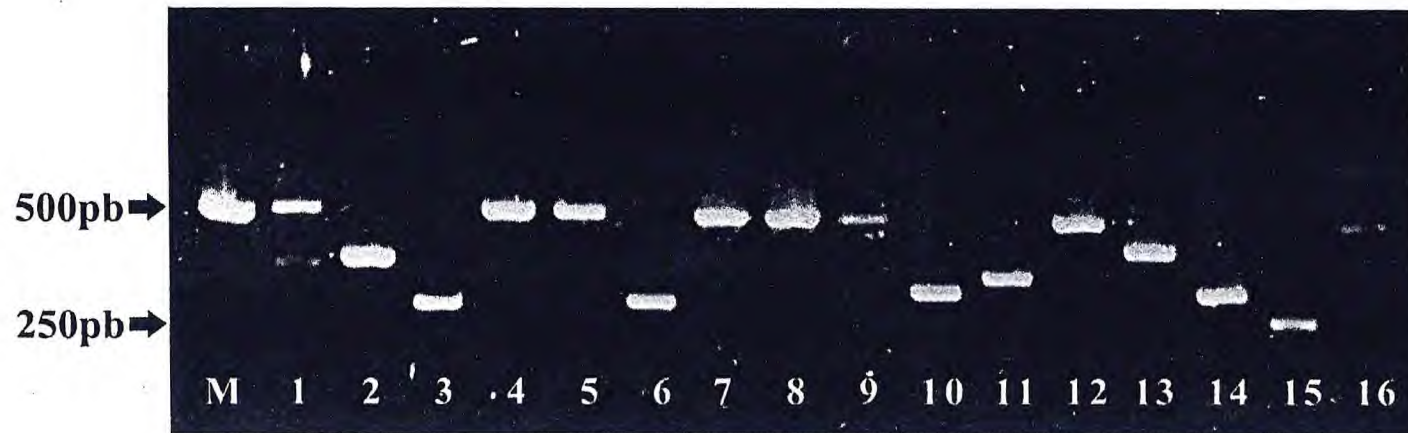


FIGURA 2.10. Seleção de clones da extremidade 5' do cDNA de espermedesina caprina por *PCR colony*. Gel representativo de análise eletroforética dos produtos de PCR obtidos por amplificação utilizando os oligonucleotídeos M13F e M13R. 1 a 16 = amostras de clones; M = marcador de massa molecular.

```
>Bodhesin-4 gene
GCNNACGTGTTTGTATCTTGTACGTGGGCCCGGTGNGNCGGNTGCTGAGGCTGGTGCCAGGCTGCGAAGATGAAGCTGTCCAGCGTCATCCCTGGGGCT
TGCTGCTCAGCACAGCCACACTGGTTTCAACAGAATCGGATGAAGACACTAGAAAATGTGGGGCGTCCACAGAGACTTCTCTGGGAGGATCTCCAGCAG
TTTCTCATGGGGGCCAAAGTGTACCTGGACCATCCTCTTGAAGAGCGGTTATACAGTTGTAAGTACTGACAATTCATTTCTCAGCCTCAACTGTAATGAAGAG
GATGTGGAAATCATAGACGGGCTGCCAGACAGTACTACATTTGGAGGTTCTGTTTCAGGGGGACCCCTGGTGTAAATCTTCTTCCAATGTCATGACCG
TGAAATACTACAGAAGTTCCAACCAGCCAGTATCTCCTTTTGATATATTTTACTACGAGCGTCCAACAGCTTAGTGA
```

FIGURA 2.11. Seqüência de nucleotídeos do cDNA codificando a espermedesina caprina Bodesina-4 (Bdh-4). Letras em itálico = seqüência nucleotídica identificada por 5'-RACE; Letras em negrito = nucleotídeos que podem codificar para resíduos de aminoácidos diferentes entre as isoformas de bodesinas; Letra com sublinhamento duplo = seqüência nucleotídica para término de tradução (codons de parada); Letras com sublinhamento simples = região para o oligonucleotídeo antisense específico SMD-AS2 usado para 5'-RACE (inclusive codons de parada).

A partir da análise do cDNA de Bdh-4 (FIGURA 2.13), deduz-se que as proteínas codificadas, apresentam 134 resíduos de aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 21 resíduos de comprimento. Esse peptídeo sinal compartilha 80 a 90% de identidade de seqüência de aminoácidos com outras espermedesinas (FIGURA 2.14A).

A análise das estruturas primárias de todas as proteínas maduras deduzidas mostrou uma região conservada que prediz um único domínio CUB (FIGURA 2.14B), um achado típico de membros da família das espermedesinas (VARELA *et al.*, 1997). As similaridades entre as isoformas 1, 2, 3 e 4 de bodesina variaram de 97 a 98%, calculadas através de ClustalW, configurado com os parâmetros originais. Bdh-2 e Bdh-4 continham uma His13 no lugar de Leu13, quando comparadas com as outras bodesinas (veja as caixas na FIGURA 2.14B). Bdh-1 e Bdh-3 apresentaram uma glutamina na posição 112, ao invés de Ser ou Thr, encontradas em Bdh-2 ou Bdh-4, respectivamente. Adicionalmente, Bdh-3 apresentou um resíduo de lisina em substituição a uma arginina presente nas bodesinas 1, 2 e 3 na posição 72. Finalmente, Bdh-1 apresentou uma leucina na posição 73, enquanto as outras bodesinas tinham uma fenilalanina. Diferenças adicionais foram observadas entre as seqüências nucleotídicas dos cDNAs das bodesinas, mas as mesmas não codificavam resíduos de aminoácidos diferentes ou estavam posicionadas na região 3' não-traduzida (3'-UTR).

A comparação da seqüência de aminoácidos predita para Bdh-4 madura, contra as seqüências polipeptídicas presentes no banco de dados do NCBI (GenBank), revelou similaridades com outras espermedesinas. As seqüências com as maiores similaridades (36 a 46%) foram alinhadas e usadas para identificar resíduos conservados em seqüências homólogas (FIGURA 2.14B). A mais alta identidade foi observada com AWN (46%). Contudo, quando as seqüências completas de aminoácidos foram comparadas, a similaridade aumentou para 52% com AWN e AQN-1. As seqüências de aminoácidos preditas para Bdh-1, -2 e -3 compartilharam 50%, 49% e 51% de similaridade com AWN, respectivamente.

TABELA 2.5. cDNA de espermedesinas de caprino (*Capra hircus*), suíno (*Sus scrofa*) e bovino (*Bos taurus*)

	5'-UTR	ORF	3'-UTR	Proteína (aa)*	cDNA**	Referência
Bdh-1	69 ^a	405 ^a	279	134 ^a	DQ204877	este trabalho
Bdh-2	69 ^a	405 ^a	278	134 ^a	EF157969	este trabalho
Bdh-3	69 ^a	405 ^a	277	134 ^a	EF157970	este trabalho
Bdh-4	69	405	-	134	EF157971	este trabalho
AWN	29	465	217	154	AJ853850	Haase <i>et al.</i> , 2005
AQN-1	29/31	399	250/276 ^b	132	AJ853854	Haase <i>et al.</i> , 2005
					AJ853855	
aSFP	29 ^c	405	252	134	M84603	Wempe <i>et al.</i> , 1992
AQN-3	29	414	266	137	AJ853851	Haase <i>et al.</i> , 2005

^aInferido por comparação com a seqüência do cDNA de Bdh-4 para o qual existe evidência experimental; ^bExistem dois cortes (*splices*) alternativos para AQN-1; ^cOs locais de início da transcrição dos genes bovinos foram inferidos por comparação de seqüências genômicas bovinas às seqüências suínas para as quais existem evidências experimentais; * = Número de resíduos de aminoácidos codificados; ** = Número de acesso à seqüência do cDNA no GenBank.

```

GCN NAC GTG TTT GTA TCT TGT ACG TGG GCC CGG TGN GNC GGN TGC TGA GGC TGG
TGC CAG GCT GCG AAG ATG AAG CTG TCC AGC GTC ATC CCT TGG GCC TTG CTG CTC
      M K L S S V I P W A L L L

AGC ACA GCC ACA CTG GTT TCA ACA GAA TCG GAT GAA GAC ACT AGA AAA TGT GGG
S T A T L V S T E S D E D T R K C G

GGC GTC CAC AGA GAC TTC TCT GGG AGG ATC TCC AGC AGT TTC TCA TGG GGG CCA
G V H R D F S G R I S S S F S W G P

AAG TGT ACC TGG ACC ATC CTC TTG AAG AGC GGT TAT ACA GTT GTA CTG ACA ATT
K C T W T I L L K S G Y T V V L T I

CCA TTT CTC AGC CTC AAC TGT AAT GAA GAG GAT GTG GAA ATC ATA GAC GGG CTG
P F L S L N C N E E D V E I I D G L

CCA GAC AGT ACT ACA TTT GGG AGG TTC TGT TCA GGG GGA CCC CTG GTG TTT AAA
P D S T T F G R F C S G G P L V F K

TCT TCT TCC AAT GTC ATG ACC GTG AAA TAC TAC AGA AGT TCC AAC CAG CCA GTA
S S S N V M T V K Y Y R S S N Q P V

TCT CCT TTT GAT ATA TTT TAC TAC GAG CGT CCA ACA GCT TAG TGA
S P F D I F Y Y E R P T A StopStop

```

FIGURA 2.13. Tradução da seqüência nucleotídica do cDNA que codifica a espermedesina caprina, Bdh-4. Letras com sublinhamento duplo = seqüência nucleotídica codificando o peptídeo sinal; Letras em negrito = seqüência nucleotídica codificando a região N-terminal de Bdh-4 madura; Stop = códon de parada.

A

```

Bdh-4      MKLSSVIPWALLLSTATLVST  21
AWN        MKLGSAILWALLLSTATLVSG  21
AQN-1     MKLGSVIPWALLLSTATLVST  21
AQN-3     MKLGSVIPWALLLSTATLVST  21
aSFP      MKLSSVIPWALLLSTATVDSM  21
          ***.*.* *****: *
  
```

B

```

          1          10          20          30          40          50          60          70
          |----- S-S -----|----- S-S -----|
Bdh-1  -----C GGVLRDFSGR ISSSFSWGPK CTWTILLKSG YTVVLTIPFL SLNCNEEDVE IIDGLPDSTT FGRLCSGGPL
Bdh-2  -----C GGVLRDFSGR ISSSFSWGPK CTWTILLKSG YTVVLTIPFL SLNCNEEDVE IIDGLPDSTT FGRLCSGGPL
Bdh-3  -----C GGVLRDFSGR ISSSFSWGPK CTWTILLKSG YTVVLTIPFL SLNCNEEDVE IIDGLPDSTT FGRLCSGGPL
Bdh-4  ESDTRKCGGVLRDFSGR ISSSFSWGPK CTWTILLKSG YTVVLTIPFL SLNCNEEDVE IIDGLPDSTT FGRLCSGGPL
AWN    AWRNRRSRSCGGVLRDPPGK IFNSDGPQKD CVWTIKVKPH FHVVAIPPL NLSGKEYVE LLDGPPGSEI IGKICGGISL
HSP-7  AWRNRRSRSCGGVLRDPPGK IFNSDGPQKD CVWTIKVKPH FHVVAIPPL NLSGKEYVE LLDGPPGSEI IGKICGGISL
AQN-1  AQNKGPCHKGGVLRDLGR ISTYEGPKTD CIWTILAKPG SRVFVAIPYL NLACGKEYVE VQDGLPGAGN YGKLCGIGL
aSFP   DWLPRNTNCGGILKEESV IATYYGPKTN CVWTIQMPPE YHVRVSIQYL QLNCNKESLE IIDGLPGSPV LGKICGSLM
AQN-3  AQNKGSDDCGGFLKNYSW ISYYKALTTN CVWTIEMKPG HKIILQILPL NLTGGKEYLE VRDQRAGPDN FLKVCGGTTF
          * ** . : : * * . . * ** . . : : * * . * * : * : * * : * * . . . . : * * :
CUB sign      C t h t t h t t t t t C a h h t t h h h t t h t C n h h t h t t t h p h C t
CUB pred      |---βa---| |---βb---| |---βc---| |---βd---| |---βe---| |---βf---| |---βg---|

          80          90          100          110
Bdh-1  VFKSSSNVMT VKYYRSSNQPVSPFDIFYE RPQA
Bdh-2  VFKSSSNVMT VKYYRSSNQPVSPFDIFYE RPSA
Bdh-3  VFKSSSNVMT VKYYRSSNQPVSPFDIFYE RPQA
Bdh-4  VFKSSSNVMT VKYYRSSNQPVSPFDIFYE RPTA
AWN    VFRSSSNIAT IKYLRTSGQR ASPFHIIYYA DPEGPLPFY FERQTIIATE KNIP
HSP-7  VFRSSSNIAT IKYLRTSGQR ASPFHIIYYA DPEGPLPFY FERQTIIATE KNIP
AQN-1  TYQSSSNALS IKYSRTAGHS ASSFDIYYG DS
aSFP   DYRSSGSIMT VKYIREPEHP ASFYEVLYFQ DPQA
AQN-3  VYQSSSNVAT VKYSRDSHHP ASSFNVIYFYG IPQAKA
          : : * * . . : : * * * . : : * * : : : .
CUB sign      t h h a t t t t a h a
CUB pred      |---βh---| |---βi---|
  
```


FIGURA 2.14. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos do peptídeo sinal (A) e das espermedesinas maduras (B) de bode, varrão, garanhão e touro. As características dos resíduos de aminoácidos que definem a assinatura (CUB sign – VARELA *et al.*, 1997) e a posição dos elementos de estrutura secundária (CUB pred – BORK & BERCKMANN, 1993) do domínio CUB estão apresentadas usando o seguinte código: a, aromáticos (Phe, Tyr, Trp); h, hidrofóbicos (Leu, Ile, Val, Met, Ala); t, *turn-like* ou polares (Gly, Pro, Asn, Gln, His, Ser, Thr); n, carregados negativamente (Glu, Asp); p, carregados positivamente (Arg, Lys); β , β -strands (marcadas de β a até β i). As duas pontes dissulfeto (S-S) entre resíduos de cisteína (C) vizinhos, os quais estão conservados em todas as moléculas de espermedesina conhecidas e em alguns domínios CUB, estão sombreados em cinza. Os resíduos de aminoácidos diferentes entre as espermedesinas estão mostrados em caixas. Foram usadas as seqüências das espermedesinas de *Sus scrofa* (CAI05910, CAI05911, CAI05914), *Equus caballus* (P80720) e *Bos taurus* (AAA30745).

4. Discussão

Previamente, nosso grupo isolou, purificou e descreveu o N-terminal e a massa molecular de uma proteína estruturalmente caracterizada como a primeira espermedesina caprina, denominada BSFP (TEIXEIRA *et al.*, 2002). Contudo, nós ainda não tínhamos descrito o gene que codifica aquela proteína. Após procedimento de 3'-RACE com o oligonucleotídeo específico SMD-SE2, um produto de aproximadamente 700pb foi amplificado a partir de primeira fita de cDNA de vesícula seminal.

Subseqüentemente às amplificações das extremidades 3' e 5', nós clonamos e seqüenciamos quatro cDNAs altamente similares. A estrutura completa dos cDNAs das bodesinas foi obtida após análise das regiões traduzidas e não-traduzidas dos fragmentos clonados de Bdh-1, -2, -3 e -4. Nós pudemos verificar que os polipeptídeos deduzidos (Bdh-1, -2, -3 e -4) apresentaram a assinatura canônica do domínio CUB (BORK & BERCKMANN, 1993).

Adicionalmente, as estruturas primárias das bodesinas foram similares às de outras espermedesinas, especialmente à de AWN de suíno. Interessantemente, o peptídeo sinal de Bdh-4 apresenta uma alta identidade de seqüência ao de outras espermedesinas. Resultados similares foram descritos em varrão por EKHLASI-HUNDRIESER *et al.* (2002) relatando uma seqüência consenso restrita às espermedesinas. Após avaliação conjunta dessas

informações, nós assumimos que todas as bodesinas são novos membros da família das espermedesinas. Contudo, até o momento, ainda não se sabe se existem outras no trato reprodutivo de bode.

Entre as proteínas deduzidas neste trabalho, Bdh-2 foi a mais similar (87%) ao N-terminal da BSFP (ECDETRKC GG VHRDFSGRISCCF) apresentado por TEIXEIRA *et al.*, (2002). Dentre os 16 resíduos de aminoácidos descritos para BSFP, 14 deles são os mesmos da Bdh-2. Os resíduos discrepantes são Cys, Cys em BSFP e Ser, Ser em todas as outras proteínas deduzidas a partir do cDNA das bodesinas. Provavelmente, os dois resíduos de aminoácidos relatados para BSFP estão errados. Isso é o mais provável pois, no presente estudo, em todos os cDNAs obtidos para as bodesinas, os dois resíduos adjacentes de cisteína foram codificados por AGC e AGT, nesta ordem. Assim, a possibilidade de erro fica diminuída devido aos múltiplos seqüenciamentos (quatro repetições para cada seqüência) que conduziram a esses resultados. Adicionalmente, existe uma grande discrepância entre os codons obtidos e aqueles que codificam resíduos de serinas (TCT, TCC, TCA ou TCG).

BERGERON *et al.* (2005) apresentaram o isolamento e a caracterização das principais proteínas do plasma seminal de carneiro (RSP). Os autores relataram a existência de uma proteína denominada RSP-15kDa, a qual foi identificada como uma espermedesina pelo seqüenciamento do seu N-terminal. Interessantemente, essa seqüência é similar àquela de Bdh-4. Dentre os 24 resíduos de aminoácidos descritos para o N-terminal de RSP-15kDa, apenas dois são diferentes em Bdh-4. Resíduos de lisina e asparagina são encontrados nas posições 9 e 15 de RSP-15kDa, em contrapartida aos de cisteína e aspartato em Bdh-4.

Uma espermedesina virtual bovina (XP_001251306), similar às bodesinas, foi deduzida por análise computacional automatizada, sendo derivada de uma seqüência genômica anotada (NW_001494379). Um método de predição de gene foi utilizado, tendo como evidência adicional etiquetas de genes expressos (EST, *Expressed Sequence Tag*). Após análise utilizando o *software* ClustalW (HIGGINS *et al.*, 1994), observou-se que a proteína virtual bovina compartilha 82 a 85% de identidade com as seqüências das bodesinas.

Poucas diferenças foram observadas entre as seqüências nucleotídicas dos cDNAs das espermedesinas. No entanto, as mesmas implicam em algumas divergências nas seqüências de aminoácidos das proteínas putativas deduzidas. As discrepâncias entre os cDNAs de Bdh-2 e Bdh-4 envolvem um códon que codifica o aminoácido polar histidina, o qual substitui o resíduo hidrofóbico leucina encontrado nas demais bodesinas, na posição 13. O mesmo resíduo polar foi também visto na seqüência do N-terminal de BSFP (TEIXEIRA *et al.*, 2002). A seqüência consenso do domínio CUB apresenta um resíduo de aminoácido

hidrofóbico na mesma posição (VARELA *et al.*, 1997). De acordo com ROMÃO *et al.*, (1997), existe um núcleo de resíduos hidrofóbicos que estabiliza a organização em β -barril e define a assinatura do domínio CUB. Nós não podemos ter certeza se esses achados indicam uma diferença significativa na estrutura de Bdh-2 e Bdh-4, quando comparado às outras espermadesinas. Contudo, a despeito do domínio CUB conservado, as espermadesinas podem apresentar achados que são únicos para cada proteína, como observado em aSFP quando comparada a PSP-I e PSP-II (ROMÃO *et al.*, 1997). Essas diferenças particulares podem ter implicações na relação estrutura-atividade e no reconhecimento entre os gametas durante o desempenho das funções reprodutivas (CALVETE *et al.*, 1995; REINERT *et al.*, 1996). Adicionalmente, a substituição de Gln112, encontrada em Bdh-1 e Bdh-3, por Ser112 ou Thr1123, em Bdh-2 ou Bdh-4, respectivamente, provavelmente não afeta a arquitetura do domínio CUB, pois esses resíduos de aminoácidos estão localizados fora da última folha- β na região C-terminal das proteínas. Finalmente, a substituição de Arg72, encontrada em Bdh-1, -2 e -4, por Lys72 em Bdh-3, trata-se de uma substituição sinônima, pois ambos os resíduos são positivamente carregados. Uma analogia pode ser feita na substituição de fenilalanina por leucina na posição 73 de Bdh-1, comparada às demais bodesinas, pois os dois resíduos de aminoácidos são hidrofóbicos. Além disso, essas substituições estão em acordo com a estrutura geral das proteínas que têm um domínio CUB consenso (BORK, 1991). Conseqüentemente, nós presumimos que essas variações podem não interferir na estrutura tridimensional das proteínas em questão.

Uma análise conjunta dos resultados nos permite afirmar que as bodesinas pertencem a uma família multigênica codificando proteínas com a assinatura conservada do domínio CUB. Além disso, os membros da família das espermadesinas compartilham estruturas tridimensionais semelhantes (ROMERO *et al.*, 1996; ROMERO *et al.*, 1997; ROMÃO *et al.*, 1997), mas têm sido associados a diferentes funções biológicas (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1998). As bodesinas deduzidas apresentaram uma mais alta identidade com Awn suína e HSP-7 eqüina. Em ambas as espécies, essas espermadesinas têm mostrado habilidades ligantes com heparina, zona pelúcida e espermatozóides (SANZ *et al.*, 1992; CALVETE *et al.*, 1993; DOSTÁLOVÀ *et al.*, 1995; REINERT *et al.*, 1997). Assim, elas parecem exercer um papel na interação oócito-espermatozóide durante o processo de fertilização (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1998). Nosso grupo tem demonstrado que espermadesinas caprinas provavelmente não ligam a heparina (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Contudo, o significado dessa inabilidade de interação com esse carboidrato modificado e seu papel na fertilização caprina se mantêm a serem elucidados.

Além disso, o presente estudo confirma que o caprino é a quinta espécie de mamífero, depois de suíno, bovino, eqüino e ovino, nas quais moléculas de espermedesinas já foram encontradas. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro relato de clonagem molecular de genes das espermedesinas de bode. Experimentos adicionais são necessários para caracterizar a função particular de cada uma dessas proteínas, para incrementar os conhecimentos acerca dos mecanismos reprodutivos na espécie caprina.

5. Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v.215, p.403–410, 1990.

ASHDOWN, R.R., DONE, S. Color Atlas of Veterinary Anatomy: The Ruminants. Barcelona: C.V. Mosby. p 1–35, 2003.

BERGERON, A., VILLEMURE, M., LAZURE, C., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* v.71, p.461–470, 2005.

BORK, P. Complement components C1r/C1s, bone morphogenetic protein 1 and *Xenopus laevis* developmentally regulated protein UVS. 22 share common repeats. *FEBS Lett.*, v.282, p.9–12, 1991.

BORK, P., BERCKMANN, G. The CUB domain. A widespread module and developmentally regulated proteins. *J. Mol. Biol.*, v.231, p.539–545, 1993.

CALVETE, J.J., SANZ, L., DOSTÁLOVÁ, Z., TÖPFER-PETERSEN, E. Characterization of AWN-1 glycosylated isoforms helps define the zona pellucida and serine proteinase inhibitor-binding region on boar spermadhesins, *FEBS Lett.*, v.334, p.37–40, 1993.

CALVETE, J.J., MANN, K., SCHAFFER, 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.*, v.365, p.179–182, 1995.

DOSTÁLOVÁ, Z., CALVETE, J.J., TÖPFER-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-Seyler*, v.376, p.237–242, 1995.

EKHLASI-HUNDRIESER, M., SINOWATZ, F., GREISER, D.E., 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.

HAASE, B., SCHLÖTTERER, C., HUNDRIESER, M.E., KUIPER, H., DISTL, O., TÖPFER-PETERSEN, E., LEEB, T. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene*, v.352, p.20–29, 2005.

HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T., THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.*, v.22, p.4673–4680, 1994.

KWOK, S.C., YANG, D., DAI, 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, 1993.

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

REINERT, M., CALVETE, J.J., 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*, v.29, p.179–186, 1997.

ROMÃO, M.J., KOLLN, I., DIAS, J.M., CARVALHO, A.L., ROMERO, A., VARELA, P.F., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. *J. Mol. Biol.*, v. 274, p.650–660, 1997.

ROMERO, A., VARELA, P.F., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of boar seminal plasma spermadhesin PSPI/PSPII, a heterodimer of two CUB domains. *FEBS Lett.*, v.382, p.15–17, 1996.

ROMERO, A., ROMÃO, M.J., VARELA, P.F., KOLLN, I., DIAS, J.M., CARVALHO, A.L., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat. Struct. Biol.*, v. 4, p.783–788, 1997.

SANZ, L., CALVETE, J.J., SCHAFER, W., SCHMID, E.R., AMSELGRUBER, W., SINOWATZ, F., EHRHARD, M., TÖPFER-PETERSEN, E. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa, *FEBS Lett.*, v.300, p.213–218, 1992.

TEDESCHI, G., OUNGRE, E., MORTARINO, M., NEGRI, 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 JR, C., 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.9, 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 isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gen. Mol. Res.*, v.5, p.79–87, 2006.

THIBAUT, C., FOURNIER-DELPECH, S. Acquisition of sperm fertilizing ability. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C., HUNTER, R.H.F., editors. *Reproduction in Mammals and Man*. Paris: Ellipses. p. 257–278, 1993.

TÖPFER-PETERSEN, E., ROMERO, A., VARELA, P.F., EKHLASI-HUNDRIESER, M., DOSTALOVA, Z., SANZ, L., CALVETE, J.J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v.30, p.217–224, 1998.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., KIRCHHOFF, C., LEEB, T., SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.159–170, 2005.

VAN ZUTPHEN, L.F.M., BALLS, M. *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Amsterdam: Elsevier Science. p. 1–1260, 2001.

VARELA, P.F., ROMERO, A., SANZ, L., ROMÃO, M.J., TÖPFER-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.

WEMPE, F., EINSPANIER, R., SCHEIT, K.H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 183, p.232–237, 1992.

***CAPÍTULO III – PERFIL DE EXPRESSÃO DAS BODESINAS
NO TRATO REPRODUTOR DO MACHO CAPRINO (*Capra hircus*)***

1. Introdução

O trato genital masculino expressa uma grande variedade de proteínas as quais interagem com a superfície dos espermatozoides durante o trânsito epididimário e também após a ejaculação (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005a). Em ungulados, proteínas denominadas espermedesinas pertencem a uma nova família de moléculas e encontram-se entre os principais componentes protéicos do plasma seminal (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005b). Essas proteínas multifuncionais de baixa massa molecular (12 a 16 kDa) exibem uma ampla variedade de ligantes, como carboidratos (SOLÍS *et al.*, 1998), inibidores de proteinase (SANZ *et al.*, 1992b), fosfolipídeos (DOSTALOVA *et al.*, 1995), bem como glicoproteínas da zona pelúcida (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1999, SANZ *et al.*, 1992). Assim, essas moléculas podem desempenhar diversas funções reprodutivas, atuando no processo de capacitação, estabilização do acrossoma ou, ainda, na interação entre gametas, durante a fecundação (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 1998). As espermedesinas já foram descritas na espécie suína (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II), eqüina (HSP-7), bovina (aSFP e Z13) e ovina (RSP-15 kDa; CALVETE *et al.*, 1995; VARELA *et al.*, 1997; REINERT *et al.*, 1997; WEMPE *et al.*, 1992; TEDESCHI *et al.*, 2000; BERGERON *et al.*, 2005).

Recentemente, nosso grupo isolou uma proteína de 12,591 kDa de massa molecular, denominada BSFP (*Buck Seminal Fluid Protein*), a partir do plasma seminal de caprinos (TEIXEIRA *et al.*, 2002), a qual foi estruturalmente 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 (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Adicionalmente, nós descrevemos um grupo de cDNAs, codificando isoformas de espermedesinas caprinas, denominadas bodesinas (MELO *et al.*, 2007). Os cDNAs foram identificados e caracterizados a partir da amplificação rápida das extremidades 3' e 5' do mRNA da vesícula seminal do bode. Estudos preliminares na espécie indicaram a vesícula seminal como o principal local de produção das bodesinas.

O objetivo do presente estudo foi investigar o perfil de transcrição dos genes das espermedesinas caprinas ao longo do trato reprodutor masculino através de qRT-PCR em tempo real.

2. Material e métodos

2.1. Animal e obtenção dos tecidos

Um macho sem raça definida da espécie caprina (*Capra hircus*) foi selecionado e submetido à colheita e avaliação de sêmen por um período de um mês. A avaliação do sêmen foi realizada conforme descrição no CAPÍTULO II deste trabalho. A última colheita de sêmen foi realizada cerca de três dias antes da obtenção dos tecidos. O animal foi anestesiado e sacrificado de acordo com as normas de bem-estar animal (VAN ZUTPHEN & BALLS, 2001). Os tecidos foram colhidos através de procedimento cirúrgico, seguindo sua localização anatômica (ASHDOWN & DONE, 2003). Os testículos (TS) com os respectivos epidídimos (EP) foram removidos do saco escrotal e da túnica vaginal. Para amostragem do tecido epididimário, foi realizado um *pool* de quatro amostras, duas provenientes da região da cabeça e outras duas da região da cauda. Após liberação da túnica albugínea, os testículos foram submetidos a um corte sagital, e um realizou-se um *pool* de quatro amostras colhidas, sendo duas obtidas de cada testículo: uma da região central, outra da região periférica do órgão. Ambas as vesículas seminais (VS), bem como a próstata (PT), foram colhidas através de uma incisão sagital no lado esquerdo da região pélvica, dando acesso à face superior da extremidade vesical da musculatura que recobre a uretra. As glândulas bulbo-uretrais (BU) foram acessadas através de incisão externa localizada na região perianal e seguindo internamente na cavidade pélvica entre a serosa intestinal e a face interna do processo íleo. As glândulas VS e BU completas foram utilizadas para amostragem tecidual. O tecido prostático foi colhido de forma mais completa possível, sendo todo o material destinado à obtenção de RNA total. Os tecidos de ducto deferente (DD) foram oriundos de duas regiões anatômicas distintas: dois fragmentos da extremidade testicular do ducto e outros dois das ampolas (situadas na junção dos músculos ísquiocarvernosos e bulboesponjoso com a bexiga). Após colheita, todos os tecidos foram rapidamente estocados em nitrogênio líquido até isolamento do RNA total.

2.2. Isolamento do RNA total

Toda a vidraria e a água utilizadas nesta etapa foram previamente tratadas para remoção e/ou inativação das enzimas que degradam o RNA (RNases). A vidraria limpa

foi submetida a tratamento por calor (150°C por 4 horas). A água ultrapura, obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), foi tratada por 24 horas com 0,01% de DEPC (dietilpirocarbonato) e, em seguida, autoclavada.

O RNA total dos tecidos foi obtido pelo método do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Desta maneira, cada tecido foi pulverizado na presença de nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo. Para cada 100 mg de amostra pulverizada, foi adicionado 1 mL de reagente Trizol, aproximadamente. Em seguida, o material foi homogeneizado usando um Potter-Elvehjem Tissue Grinder (Kontes-Fisher, Suwanee, USA). Após homogeneização, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado, contendo membranas celulares, polissacarídeos e DNA de alta massa molecular, foi descartado. A fase líquida foi transferida para um tubo limpo para a realização da separação de fases. Para isso, a mesma foi previamente incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados (para cada 1 mL de Trizol utilizado) e, após agitação vigorosa, foi deixado em repouso por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. Cada amostra foi, então, centrifugada a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, para separação em três camadas: uma vermelha (camada inferior), uma intermediária e uma aquosa clara (camada superior). Esta última foi, então, recuperada para um tubo limpo, para precipitação do RNA. Para isso, foram adicionados 0,5 mL de álcool isopropílico (para cada 1 mL de Trizol utilizado), seguindo-se uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente (25°C). O material foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA total foi submetido a uma lavagem utilizando 1 mL de solução de etanol a 75% (para cada 1 mL de Trizol utilizado) e centrifugação a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O pellet de RNA foi seco ao ar por 5 a 10 minutos e, em seguida, hidratado por 10 minutos a 55°C em 100 µL de água livre de RNase. O rendimento e a qualidade dos RNAs obtidos foram determinados por espectrofotometria a 260 e 280 nm, utilizando um GeneQuant Pro RNA/DNA Calculator (GE Healthcare, Piscataway, EUA). Para isso, uma alíquota de 10 µL foi removida e, após uma diluição de 10 vezes, a absorbância foi mensurada. A concentração de RNA foi determinada usando a seguinte fórmula:

$$[\text{RNA}] = (\text{Abs}_{260} / 0,025) \times 10$$

Onde: [RNA] corresponde à concentração de RNA em µg/mL, Abs₂₆₀ corresponde à absorbância mensurada a 260 nm, 0,025 é o fator de conversão relacionando a absorbância à concentração e 10 é o fator de diluição utilizado.

A qualidade dos RNAs obtidos foi inferida pela razão ($R_{260/280}$) entre as absorvâncias mensuradas a 260 e 280 nm. Foram realizadas duas extrações de RNA total para cada amostra tecidual. Aquelas que apresentaram melhores valores de R e mais altas concentrações de RNA foram utilizadas para transcrição reversa.

2.3. Transcrição reversa

A síntese do cDNA foi realizada para todos os tecidos coletados (VS, TS, BU, EP, DD e PT) utilizando RNA total, adaptador-3' Oligo(dT)₁₈, denominado QT (5'-CAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC(T₁₈)-3'; Promega, Madison-WI, USA) e Superscript III H⁻ (Invitrogen, Carlsbad-CA, EUA) em um volume total de 15 µL. Inicialmente as amostras contendo 1,2 µg de RNA total, juntamente 500 ng/µl de com QT, foram aquecidas a 70°C por 5 a 10 minutos e, imediatamente esfriadas a 4°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados: dATP, dCTP, dGTP e dTTP (até concentração final de 0,5 mM de cada dNTP), 5 µL de tampão de reação (5x concentrado, fornecido juntamente com a enzima), 1 µL de inibidor de RNase (40U/µL), 100 U de Superscript III H⁻ e água ultra-pura destilada livre de RNase. O material foi incubado por 60 minutos a 37°C para síntese do cDNA e, posteriormente, a 70°C por 15 minutos, para inativação da enzima.

2.4. Construção das curvas-padrão de cDNA

Os controles externos consistiram de plasmídios purificados contendo insertos das bodesinas. Clones dos cDNAs das bodesinas 1, 2 e 3 (Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3) foram produzidos em sistema pGEM-T Easy (Promega, Madison, EUA), conforme metodologia descrita no CAPÍTULO II deste trabalho. Os plasmídeos dos clones selecionados (denominados pBDH-1, pBDH-2 e pBDH-3, para as Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3, respectivamente) foram purificados e submetidos a seqüenciamento de nucleotídeos através do método de terminação em cadeia (Dye terminator chemistry) utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator kit (GE Healthcare, EUA). Cada clone foi seqüenciado, no mínimo, duas vezes no sentido senso e duas no sentido antisenso, utilizando oligonucleotídeos flanqueadores do inserto (M13F ou T7 e M13R ou SP6), e o seqüenciador de nucleotídeos MegaBACE DNA Analysis System (GE Healthcare, EUA). Os cDNAs plasmidiais foram, então, quantificados por mensuração da Abs₂₆₀ em

espectrofotômetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (GE Healthcare, Piscataway, EUA). O número correspondente de número de cópias de DNA foi calculado usando a seguinte proporção:

$$1 \mu\text{g de DNA de } 3000 \text{ pb} = 1 \text{ pmol} = 3,02 \times 10^{11} \text{ moléculas}$$

Diluições seriadas contendo quantidades conhecidas de DNA dos plasmídios foram usadas para construção de curvas-padrão por PCR em tempo real (Ct *versus* número de moléculas).

2.5. PCR em tempo real

As amplificações em tempo real de Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3 foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos específicos apresentados na TABELA 3.1. Um oligonucleotídeo senso específico (BDH-SE) foi desenhado em uma região conservada entre as três espermedesinas (FIGURA 3.1). Três oligonucleotídeos antisense, denominados BDH-AS1, BDH-AS2 e BDH-AS3, foram desenhados para amplificar cada isoforma de espermedesina caprina, Bdh-1 (número de acesso DQ204877), Bdh-2 (número de acesso EF157969) e Bdh-3 (número de acesso EF157970), respectivamente. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (SP, Brasil).

As amplificações das bodesinas foram conduzidas em um equipamento Rotor-Gene 3000 (FIGURA 3.2A), operado através do respectivo software Rotor Gene 6.0.19 (FIGURA 3.2B; Corbett Research, Mortlake, Australia). Cada reação consistiu de 3 μL de DNA molde (cDNA transcrito reversamente a partir de 72 a 0,28 ng de RNA total, ou DNA plasmidial de 138 ng a 138 fg), 500 nM de oligonucleotídeos, 10 μL de SYBR Green PCR Core Reagent (Applied Biosystems, Foster City-CA, EUA), em um volume de reação de 20 μL . As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos em 45 repetições. A fluorescência foi detectada na faixa de 494 a 521 nm, durante a etapa de extensão. O limiar de detecção da fluorescência (*threshold*) para as amplificações foi determinado de forma automática pelo software Rotor Gene 6.0.19, utilizando os parâmetros originais (*default*). Assim, os valores de Ct para cada grupo de reações a serem comparadas foram determinados assumindo-se um mesmo valor de limiar. Adicionalmente essas reações foram realizadas com a mesma quantidade inicial de cDNA (transcrito reversamente a partir de RNA total).

Nos experimentos utilizando como molde os cDNAs oriundos de diferentes tecidos, os genes de referência (*house-keeping genes*) escolhidos foram β -actina e/ou β -globina. Para amplificação desses genes, foram utilizados os respectivos pares de oligonucleotídeos (TABELA 3.1).

TABELA 3.1. Oligonucleotídeos específicos utilizados para amplificação em tempo real das espermadesinas de caprino (Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3)

Nome	Seqüência nucleotídica
BDH-SE	5'- TGGACCATCCTCTTGAAGA -3'
BDH-AS1	5'- CTGAACAGAGCCTCCCAA -3'
BDH-AS2	5'- CTGAACAGAACCTCCCAA -3'
BDH-AS3	5'- CTGAACAGAACTTCCCAA -3'
ACT-SE	5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'
ACT-AS	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'
GLOB-SE	5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3'
GLOB-AS	5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCCGTG-3'

Para investigar a especificidade das amplificações, ao término de cada reação, foram traçadas as curvas *melting* para determinação dos respectivos valores de T_m (*melting temperature*) dos produtos obtidos. O procedimento foi realizado na faixa de temperatura de 55 a 90°C, com taxa de aquecimento de 1°C a cada 5 segundos, e detecção contínua da fluorescência. Adicionalmente, amostras dos plasmídeos pBDH-1, pBDH-2 e pBDH-3, em concentrações de 5,7, 3,75 e 6,9 ng/ μ L, respectivamente, foram submetidos a amplificações com os três pares de oligonucleotídeos (BDH-SE/BDHAS1, BDH-SE/BDHAS2 e BDH-SE/BDHAS3). Os produtos das amplificações foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,8% e revelados com brometo de etídio.

```

Bdh-1      TGT GGG GGG GTC CTC AGA GAC TTC TCT GGG AGG ATC TCC AGC AGT TTC TCA TGG GGG CCA
Bdh-2      TGT GGG GGG GTC CAC AGA GAC TTC TCT GGG AGG ATC TCC AGC AGT TTC TCA TGG GGG CCA
Bdh-3      TGT GGG GGC GTC CTC AGA GAC TTC TCT GGG AGG ATC TCC AGC AGT TTC TCA TGG GGG CCA
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Bdh-1      AAG TGT ACC TGG ACC ATC CTC TTG AAG AGC GGT TAT ACA GTT GGA CTG ACA ATT CCA TTT
Bdh-2      AAG TGT ACC TGG ACC ATC CTC TTG AAG AGC GGT TAT ACA GTT GGA CTG ACG ATT CCA TTT
Bdh-3      AAG TGT ACC TGG ACC ATC CTC TTG AAG AGC GGT TAT ACA GTT GGA CTG ACG ATT CCA TTT
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Bdh-1      CTC AGC CTC AAC TGT AAT GAA GAG GAT GTG GAA ATC ATA GAC GGG CTG CCA GAC AGT ACT
Bdh-2      CTC AGC CTC AAC TGT AAT GAA GAG GAT GTG GAA ATC ATA GAC GGG CTG CCA GAC AGT ACT
Bdh-3      CTC AGC CTC AAC TGT AAT GAA GAG GAT GTG GAA ATC ATA GAC GGG CTG CCG GAC AGT ACT
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Bdh-1      ACA TTT GGG AGG CTC TGT TCA GGG GGA CCC CTG GTG TTT AAA TCT TCT TCC AAT GTC ATG
Bdh-2      ACA TTT GGG AGG TTC TGT TCA GGG GGA CCC CTG GTG TTT AAA TCT TCT TCC AAT GTC ATG
Bdh-3      ACA TTT GGG AAG TTC TGT TCA GGG GGA CCC CTG GTG TTT AAA TCT TCT TCC AAT GTC ATG
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Bdh-1      ACC GTG AAA TAC TAC AGA AGT TCC AAC CAG CCA GTA TCT CCT TTT GAT ATA TTT TAC TAC
Bdh-2      ACC GTG AAA TAC TAC AGG AGT TCC AAC CAG CCA GTA TCT CCT TTT GAT ATA TTT TAC TAC
Bdh-3      ACC GTG AAA TAC TAC AGA AGT TCC AAC CAG CCA GTA TCT CCT TTT GAT ATA TTT TAC TAC
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Bdh-1      GAG CGT CCA CAG GCT TAG TGA
Bdh-2      GAG CGT CCA TCA GCT TAG TGA
Bdh-3      GAG CGT CCA CAG GCT TAG TGA
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIGURA 3.1. Localização das seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real das espermedesinas caprinas. Seqüências nucleotídicas dos cDNAs que codificam as três isoformas de espermedesinas caprinas (bodesinas), denominadas Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3. Caixas cinzas = nucleotídeos que podem codificar para resíduos de aminoácidos diferentes entre as isoformas de bodesinas; Letras com sublinhamento duplo = região para o oligonucleotídeo senso específico denominados BDH-SE; Letras com sublinhamento simples = região para os oligonucleotídeos antisense específicos denominados BDH-AS1, BDH-AS2 e BDH-AS3.

2.6. Cálculos e análise estatística

O número mínimo de ciclos de PCR necessários para produzir um sinal de fluorescência detectável acima do limiar (*Ct*, *threshold cycle*) foi calculado após duas ou três experimentações e expresso como média \pm desvio padrão ou média \pm erro padrão. Quando necessário, os valores de *Ct* foram comparados através do teste *t* de Student, a um nível de significância de 0,05. Os valores de *Tm* (temperatura de *melting*) para os produtos de PCR foram igualmente representados como média \pm desvio padrão.

A quantificação absoluta dos níveis de transcrição das bodesinas 1, 2 e 3, em vesícula seminal, foi realizada através da forma descrita por OVERBERGH *et al.*

(1999). Os valores obtidos foram normalizados para a quantidade inicial de RNA total utilizada (BUSTIN, 2000). O número total de moléculas, calculado para cada bodesina, foi expresso como média \pm erro padrão.

A variação intra-experimentação para as quantificações em vesícula seminal foi inferida através dos valores de CV, expressos em percentual, calculados para mensurações de Ct. A variação inter-experimentação para cada grupo de reações foi acessada através da determinação da eficiência (E) e da linearidade das curvas de Ct *versus* concentração de DNA (ng/ μ L). O valor de E foi calculado a partir da fórmula:

$$E = 10^{(-1/S)} - 1$$

Onde S (*slope*) é a inclinação da curva da curva.

A linearidade foi inferida pelo valor do coeficiente de correlação de Pearson ao quadrado (R^2).

A quantificação das bodesinas nos demais tecidos do trato reprodutor do bode foi realizada comparativamente a vesícula seminal, utilizando o método do $\Delta\Delta$ Ct, com a fórmula descrita por PFAFFL *et al.* (2002). Os resultados foram, adicionalmente, normalizados para ambos os genes de referência, β -actina ou β -globina.

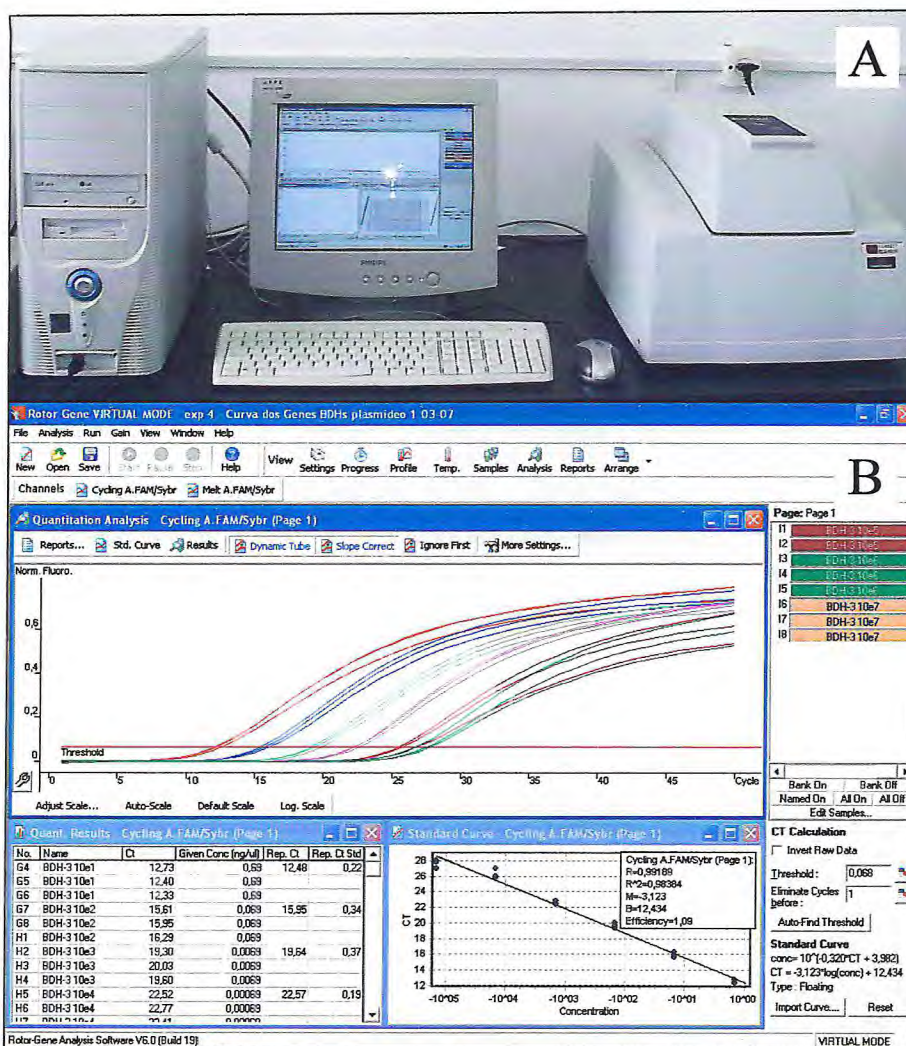


FIGURA 3.2. Sistema para realização de PCR em tempo real. (A) Equipamento Rotor Gene 3000, acoplado a um computador. (B) Ilustração de uma corrida típica utilizando o software Rotor Gene 6.0.19.

3. Resultados

O caprino selecionado para obtenção dos tecidos apresentava boas condições sanitárias e uma muda dentária. As amostras de sêmen colhidas apresentaram os parâmetros físicos (aspecto, cor e volume) dentro do considerado fisiológico para a espécie. Já os parâmetros microscópicos, ou seja, motilidade massal e motilidade individual progressiva, foram sempre superiores a 3,0 e 70%, respectivamente.

Valores de rendimento e de qualidade do RNA total obtido a partir dos tecidos do trato reprodutor do bode estão apresentados na TABELA 3.2. O RNA total de

próstata não foi utilizado para síntese de cDNA, e, portanto, não foi utilizado nos experimentos de PCR em tempo real.

Algum nível de amplificação das bodesinas foi detectado em todos os tecidos examinados, com exceção de ducto deferente (DD) (FIGURA 3.3). As amplificações de β -actina, bem como as de β -globina, ocorreram em todos os tecidos examinados.

TABELA 3.2. Parâmetros qualitativos e quantitativos mensurados no processo de purificação de RNA total a partir dos tecidos do trato reprodutor de caprino.

Tecido	Massa de tecido (mg)	Concentração de RNA ($\mu\text{g/mL}$)	$R_{260/280}$	RNA/tecido* ($\mu\text{g/mg}$)
VS	143,5	1105 ^a	1,90	0,77
	143,5	1760 ^b	1,89	1,23
TS	145,2	1050 ^a	1,84	0,72
	145,2	799 ^b	1,98	0,55
BU	40,0	830 ^a	2,00	2,07
	40,0	860 ^b	2,05	2,15
EP	105,6	400 ^b	1,78	0,38
	105,6	650 ^a	1,54	0,62
DD	35,0	55 ^b	1,65	0,15
	35,0	95 ^a	1,8	0,27
PT	36,2	55 ^b	2,00	0,15
	36,2	35 ^b	3,00	0,10

* Rendimento de RNA total para cada tecido. ^a = amostras utilizadas para transcrição reversa. ^b = amostras descartadas. VS = vesícula seminal, TS = testículo, BU = glândula bulbo-uretral, EP = epidídimo, DD = ducto deferente, PT = próstata.

Os valores de T_m calculados para os produtos de amplificação das bodesinas a partir de cDNA de VS, TS, BU e EP, bem como aqueles obtidos para os plasmídios purificados pBDH-1, pBDH-2 e pBDH-3 estão apresentados na TABELA 3.3 e na TABELA 3.4. As respectivas curvas de *melting* estão plotadas na FIGURA 3.4.

Os produtos das reações de PRC em tempo real das bodesinas utilizando cDNA de VS, TS, BU e EP, foram adicionalmente analisados por eletroforese em gel de agarose (FIGURA 3.5).

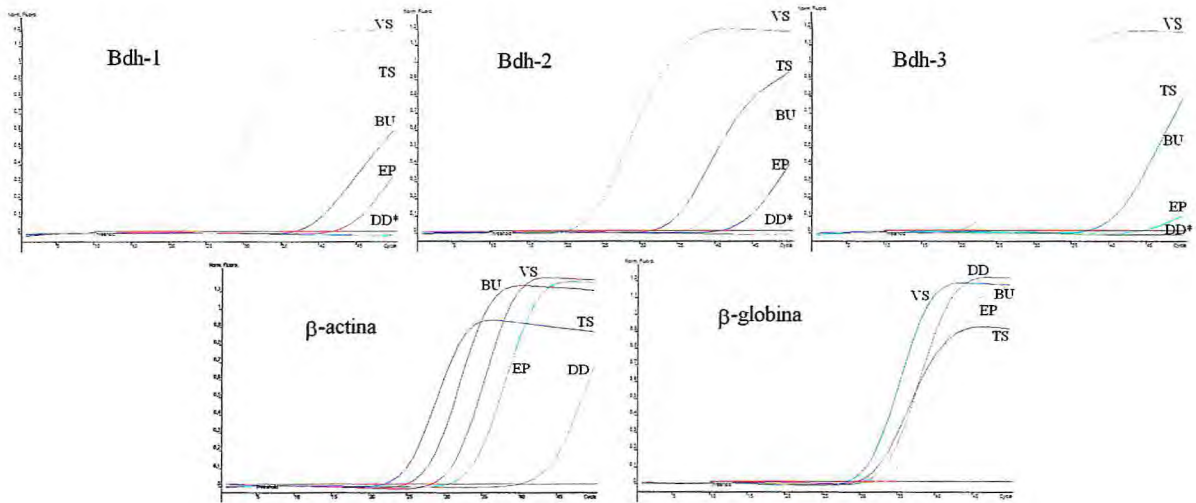


FIGURA 3.3. Curvas de fluorescência *versus* número de ciclos para amplificação em tempo real das bodesinas (Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3) e dos genes de referência β -actina e β -globina, utilizando cDNA de vesícula seminal (VS), testículo (TS), epidídimo (EP), glândulas bulbo-uretrais (BU) e ducto deferente (DD). A fluorescência está plotada em unidades arbitrárias. * = sinal de fluorescência abaixo do limiar (*threshold*) durante todos os ciclos.

TABELA 3.3. Valores médios de temperatura de *melting* (T_m) calculados para os produtos de PCR em tempo real utilizando clones de bodesinas e cDNA de vesícula seminal

DNA molde	T_m ($^{\circ}\text{C}$) \pm dp (n)			
	Bdh-1 ^c	Bdh-2 ^d	Bdh-3 ^e	Média
Clone ^a	78,31 \pm 0,32	78,37 \pm 0,09	78,34 \pm 0,26	78,43 \pm 0,25
	(n = 15)	(n = 12)	(n = 18)	(n = 45)
cDNA ^b	78,19 \pm 0,21	78,35 \pm 0,30	78,02 \pm 0,29	78,18 \pm 0,30
	(n = 12)	(n = 12)	(n = 12)	(n = 36)

^a concentração de DNA plasmidial = 3,75 a 6,9 ng/ μL . ^b concentração de DNA = 0,0144 a 0,144 ng/ μL . ^c amplificações utilizando os oligonucleotídeos BDH-SE e BDH-AS1. ^d amplificações utilizando os oligonucleotídeos BDH-SE e BDH-AS2. ^e amplificações utilizando os oligonucleotídeos BDH-SE e BDH-AS3.

TABELA 3.4. Valores médios de temperatura de *melting* (T_m) calculados para os produtos de PCR em tempo real utilizando cDNA (transcrito reversamente a partir de 3,6 ng/ μ L de RNA total) de testículo (TS), glândula bulbo-uretral (BU) e epidídimo (EP)

Espermadesina	T_m ($^{\circ}$ C) (\pm dp)		
	TS	BU	EP
Bdh-1 ^a (n = 3)	77,87 \pm 0,84	78,54 \pm 0,11	78,55 \pm 0,05
Bdh-2 ^a (n = 3)	77,81 \pm 0,59	78,19 \pm 0,12	78,33 \pm 0,06
Bdh-3 ^a (n = 3)	77,71 \pm 0,67	78,37 \pm 0,08	78,43 \pm 0,03
Média (n = 9)	77,80 \pm 0,08	78,37 \pm 0,18	78,44 \pm 0,12

^a ampliações utilizando os oligonucleotídeos BDH-SE e BDH-AS1. ^b ampliações utilizando os oligonucleotídeos BDH-SE e BDH-AS2. ^c ampliações utilizando os oligonucleotídeos BDH-SE e BDH-AS3.

Os valores de Ct calculados para reações utilizando pBDH-1, pBDH-2 e pBDH-3 como moldes, e as diferentes combinações de oligonucleotídeos senso/antiseno (BDH-SE/BDH-AS1, BDH-SE/BDH-AS2 e BDH-SE/BDH-AS3) estão resumidos na TABELA 3.5.

A quantificação relativa das bodesinas em vesícula seminal está indicada na FIGURA 3.6. Adicionalmente, as eficiências (E) das reações de amplificação no tecido foram comparadas com aquelas produzidas em PCR com os plasmídeos pBDH-1, pBDH-2 e pBDH3 (FIGURA 3.7). As linearidades foram inferidas pelos valores de R^2 representados próximo à equação de cada curva. As variações intra-experimentação para as ampliações com cDNA e com plasmídeo podem ser avaliadas pelos valores de CV (%) descritos na TABELA 3.6 e TABELA 3.7.

A quantificação das bodesinas nos demais tecidos (TS, BU, EP e DD) relativo a vesícula seminal está apresentada na FIGURA 3.8. Os valores estão normalizados para os genes de referência β -actina ou β -globina.

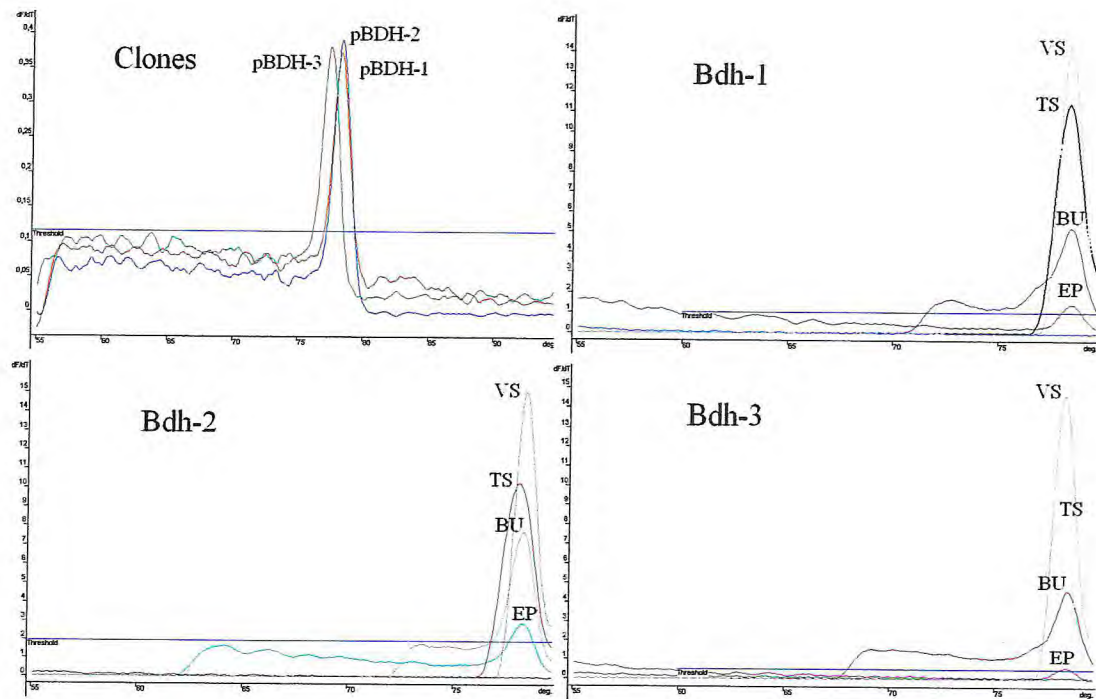


FIGURA 3.4. Curvas de *melting* para os produtos de amplificação em tempo real das bodesinas (Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3) utilizando os plasmídios os purificados pBDH-1, pBDH-2 e pBDH-3 ou os cDNAs de vesícula seminal (VS), testículo (TS), epidídimo (EP) e glândulas bulbo-uretrais (BU).

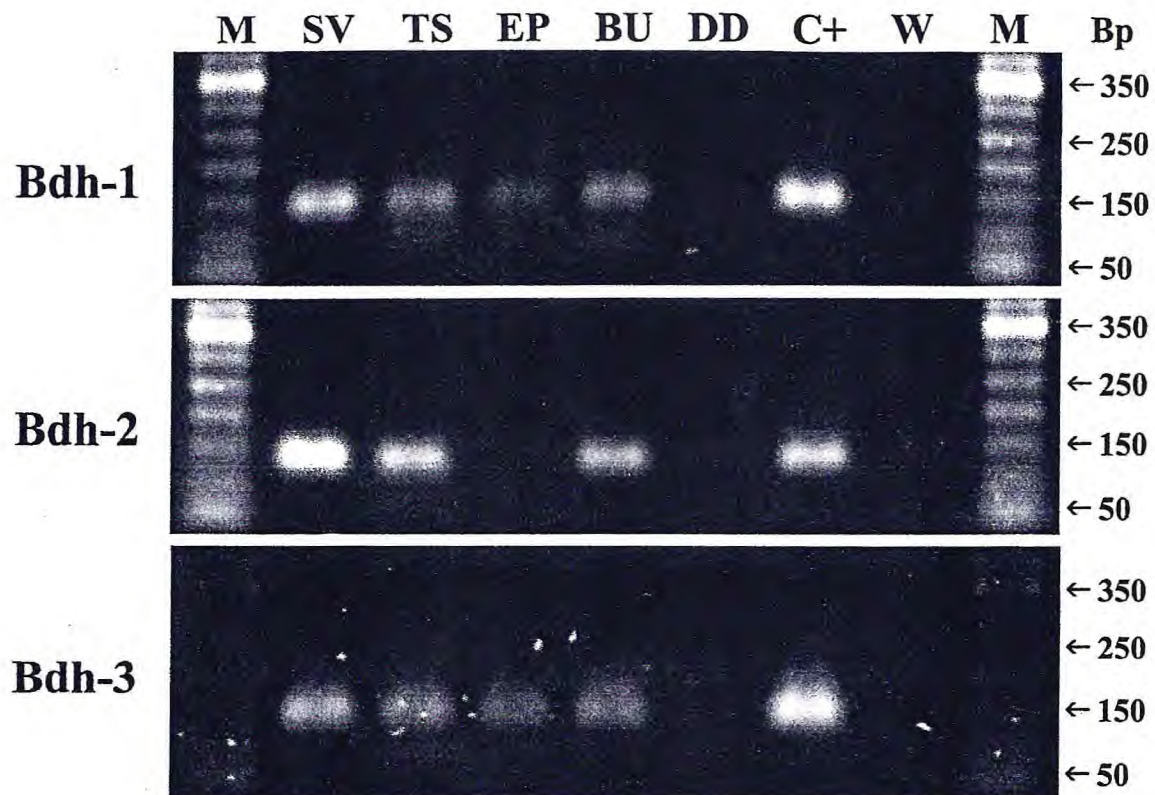


FIGURA 3.5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos das ampliações das bodesinas em tecidos do trato reprodutor do bode. VS = vesícula seminal; TS = testículo; EP = epidídimo; BU = glândulas bulbo-uretrais; DD = ducto deferente. O cDNA foi omitido nas reações de controle negativo (W). Plasmídios contendo insertos de bodesinas (pBDH-1, pBDH-2 e pBDH3) foram usados como molde nas reações de controle positivo (C+).

TABELA 3.5. Valores médios de Ct (*Threshold cycle*) calculados através de PCR em tempo real utilizando plasmídios com insertos de bodesinas (pBDH-1, pBDH-2 e pBDH3), um oligonucleotídeo senso BDH-SE e diferentes oligonucleotídeos antisenso específicos (BHD-AS1, BHD-AS2 e BHD-AS3)

Plasmídeo	Oligonucleotídeo antisenso	Ct ± ep
pBDH-1 (5,7 ng/μL)*	BDH-AS1	5,46 ± 0,46 ^a
	BDH-AS2	7,38 ± 0,38 ^b
	BDH-AS3	20,06 ± 0,21
pBDH-2 (3,75 ng/μL)*	BDH-AS1	11,45 ± 0,32
	BDH-AS2	6,27 ± 0,53
	BDH-AS3	15,64 ± 0,14
pBDH-3 (6,9 ng/μL)*	BDH-AS1	19,85 ± 0,06
	BDH-AS2	10,3 ± 0,96 ^a
	BDH-AS3	7,54 ± 0,30 ^b

*Concentração de DNA utilizada em cada grupo de reações. Para todas as comparações dentro de cada grupo houve diferença significativa ($p < 0,001$). As letras ^{a,b} indicam diferença significativa com $p < 0,05$.

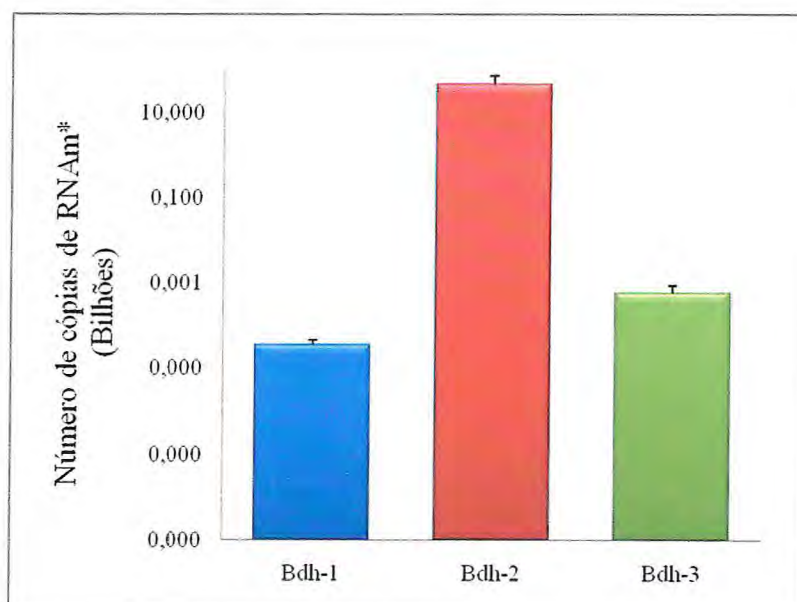


FIGURA 3.6. Quantificação relativa dos níveis de transcritos das bodesinas em vesícula seminal, acessada através de PCR em tempo real. *Os valores estão normalizados para a quantidade inicial de RNA total (ng). Bdh-1 = bodesina 1; Bdh-2 = bodesina 2; Bdh-3 = bodesina 3.

TABELA 3.6. Variação intra-experimento para valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos a partir de PCR em tempo real utilizando cDNA de vesícula seminal (transcrito reversamente a partir de RNA total)

Bodesina	[RNA total] (ng/ μ L)	Ct	Média	CV(%)
Bdh-1	0,1440	24,75	24,63	0,69
		24,51		
	0,0720	25,25	25,21	0,22
		25,17		
	0,0144	27,01	27,00	0,08
		26,98		
Bdh-2	0,1440	23,23	23,31	0,46
		23,38		
	0,0720	23,69	23,83	0,83
		23,97		
	0,0144	25,15	25,13	0,11
		25,11		
Bdh-3	0,1440	23,72	23,69	0,18
		23,66		
	0,0720	24,52	24,51	0,06
		24,50		
	0,0144	26,15	25,81	1,89
		25,46		

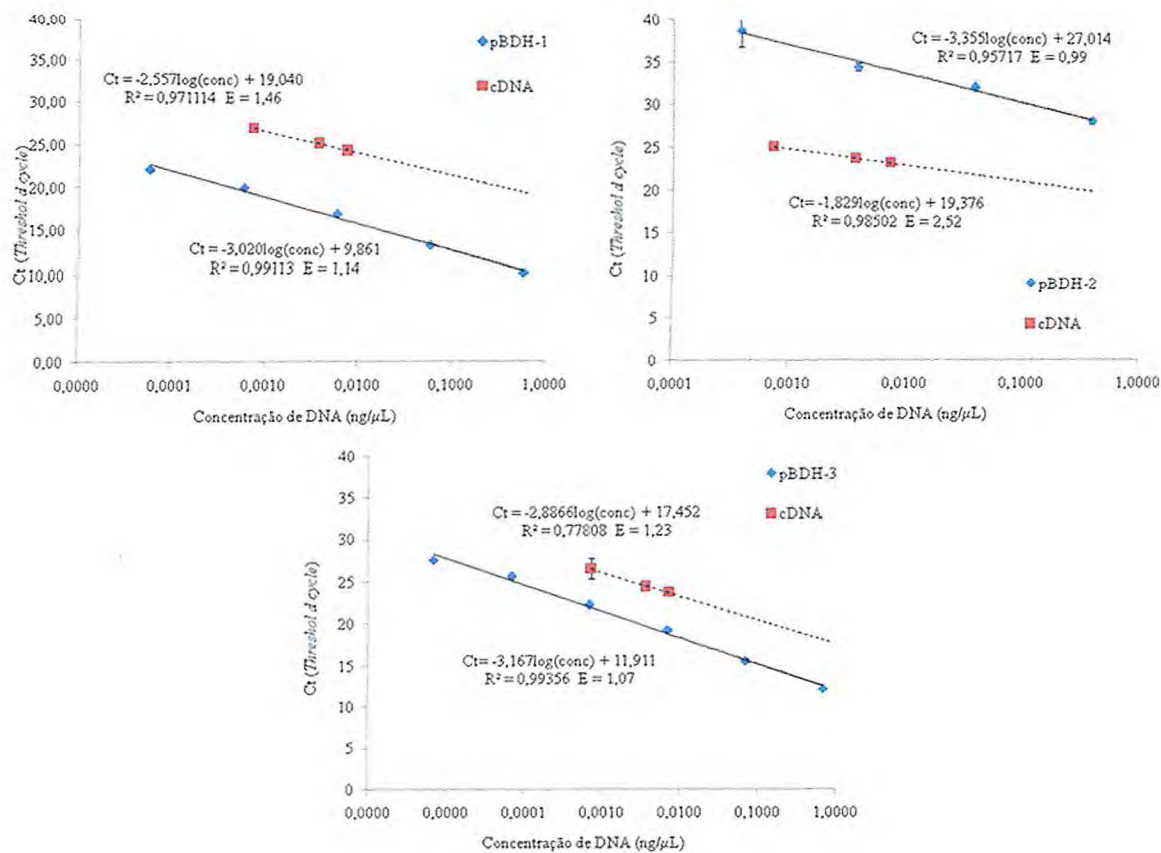


FIGURA 3.7. Comparação das eficiências de reações de PCR em tempo real para amplificação das bodesinas 1, 2 e 3. Curvas de Ct *versus* concentração de DNA (cDNA transcrito reversamente a partir de RNA total de vesícula seminal ou DNA plasmidial contendo insertos de bodesinas, pBDH-1, pBDH-2 ou pBDH3).

TABELA 3.7. Variação intra-experimento para valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos a partir de PCR em tempo real utilizando DNA plasmidial de clones das bodesinas

Palsmídio	[DNA] (ng/μL)	Ct	Média	CV(%)	
pBDH-1	0,5700000	10,32	10,34	0,27	
		10,36			
	0,0570000	13,43	13,49	0,68	
		13,56			
	0,0057000	17,16	17,13	0,25	
		17,10			
	0,0005700	20,18	20,07	0,74	
		19,97			
	0,0000570	22,30	22,15	0,96	
		22,00			
pBDH-2	0,3750000	28,15	28,39	1,19	
		28,63			
	0,0375000	32,29	32,17	0,50	
		32,06			
	0,0037500	34,22	34,55	1,37	
		34,89			
	0,0003750	40,11	38,78	4,85	
		37,45			
	pBDH-3	0,6900000	12,09	12,05	0,41
			12,02		
0,0690000		15,33	15,49	1,51	
		15,66			
0,0069000		19,02	19,17	1,11	
		19,32			
0,0006900		22,24	22,18	0,35	
		22,13			
0,0000690		25,42	25,55	0,72	
		25,68			
0,0000069	27,70	27,58	0,59		
	27,47				

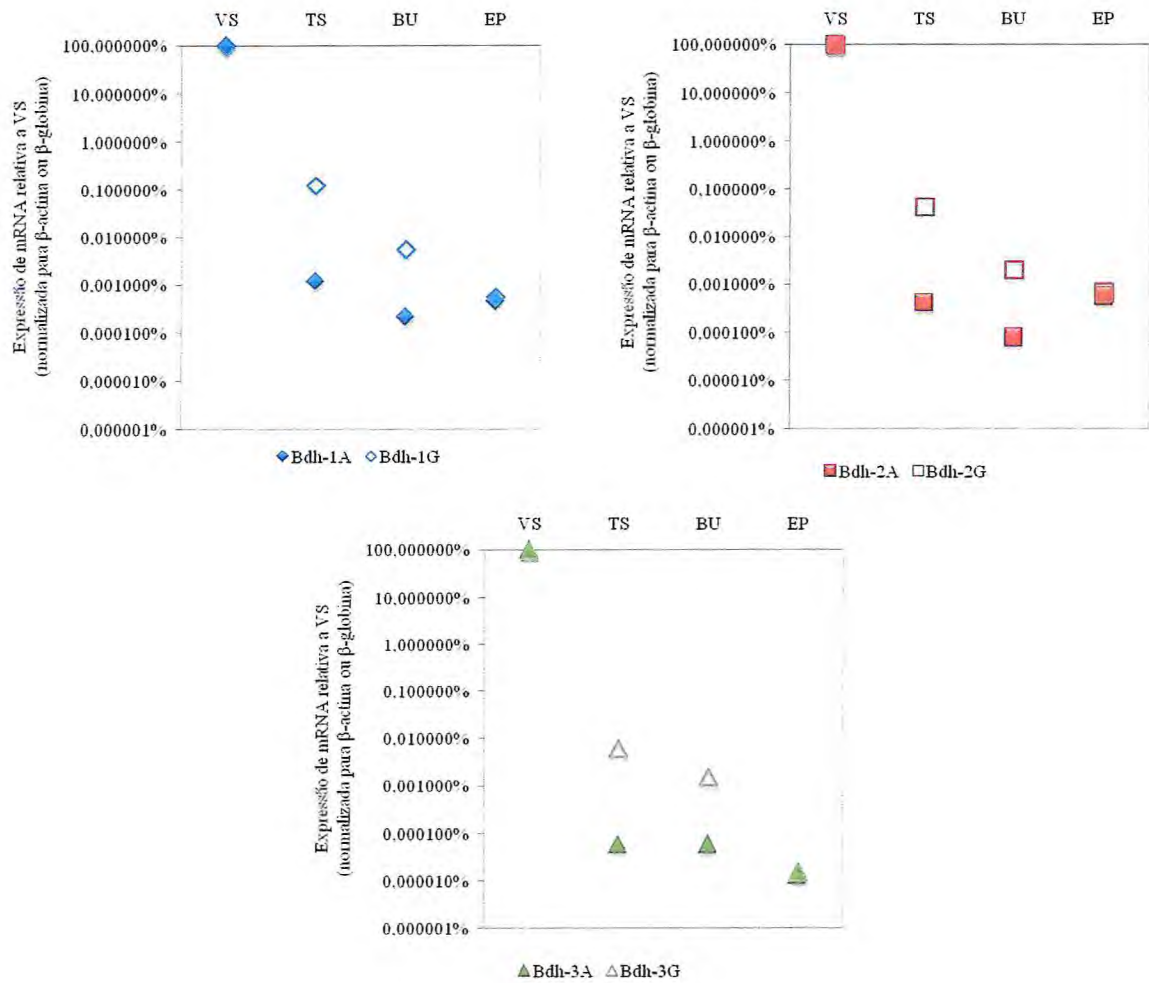


FIGURA 3.8. Quantificação dos níveis de transcrição das bodesinas 1, 2 e 3 em testículo (TS), epidídimo (EP) e glândulas bulbo-uretrais (BU), relativo a vesícula seminal (VS). Bdh-1A, Bdh-2A e Bdh-3A = valores para as bodesinas 1, 2 e 3, respectivamente, normalizados para o gene de referência β -actina. Bdh-1G, Bdh-2G e Bdh-3G = valores para as bodesinas 1, 2 e 3, respectivamente, normalizados para os genes de referência β -globina ou β -actina.

4. Discussão

Recentemente, nossa equipe descreveu um grupo de cDNAs, codificando isoformas de espermadesinas caprinas, denominadas bodesinas (MELO *et al.*, 2007). Os cDNAs foram identificados e caracterizados a partir da amplificação rápida das extremidades 3' e 5' do mRNA da vesícula seminal do bode. No presente estudo nós investigamos o perfil de transcrição dos genes das bodesinas ao longo do trato reprodutor masculino. Para isso, os RNAs totais dos principais órgãos, glândulas e ductos do trato reprodutor do bode foram purificados e submetidos a qRT-PCR em tempo real. Adicionalmente, a quantificação absoluta do número de cópias de transcritos das bodesinas 1, 2 e 3 foi calculado em vesícula seminal.

A expressão das espermadesinas ao longo do trato reprodutor masculino não tem sido sistematicamente estudada. O conhecimento das diferenças nos padrões de expressão ao longo do trato reprodutor masculino e na abundância relativa das proteínas pode contribuir para desvendar a fisiologia espécie-específica dos espermatozoides mamíferos (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2007).

Os tecidos de VS, TS, BU, EP, PT e DD foram submetidos a uma amostragem representativa, considerando-se a morfologia dos mesmos. Dentre eles, a próstata (PT) não pôde ser utilizada para síntese de cDNA devido ao baixo rendimento de RNA total obtido. Tal fato deve-se principalmente à dimensão reduzida da glândula na espécie caprina. Adicionalmente, a mesma apresenta-se dispersa sobre a musculatura da uretra e entremeada com tecido conectivo (KONIG & LIEBICH, 2004).

Todos os tecidos estudados, com exceção de ducto deferente (DD), apresentaram algum nível de transcrição dos genes das bodesinas. Tal fato pôde ser constatado pelo aumento da fluorescência durante os ciclos de PCR. Apesar de não ter ocorrido amplificação de nenhuma das espermadesinas em DD, a qualidade do RNA mensageiro transcrito reversamente *in vitro* foi acessada pelas amplificações de β -actina e β -globina.

A especificidade das amplificações das bodesinas em vesícula seminal pôde ser comprovada pela similaridade entre os valores das temperaturas de *melting* dos produtos obtidos (T_m média = $78,18 \pm 0,30$) e aqueles obtidos com os plasmídios purificados pBDH-1, pBDH-2 e pBDH-3 (T_m média = $78,43 \pm 0,25$). O mesmo foi observado para os demais tecidos, onde a T_m média variou de $77,80 \pm 0,08$ em TS a $78,44 \pm 0,12$ em EP. A especificidade das reações de PCR em tempo real pode adicionalmente ser

confirmada pelos traçados das curvas de *melting* (DUSSAULT & POULIOT, 2006). Nas mesmas foram verificados picos únicos indicativos da ausência de formação de produtos de amplificação secundários, dímeros de oligonucleotídeos ou de amplificações não-específicas, como descrito por KUBISTA *et al.* (2006).

A eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de PCR das bodesinas em VS, TS, BU e EP, resultou na observação de bandas simples de *amplicons* de aproximadamente 130 bp. A ausência de bandas múltiplas está condizente com amplificações específicas. Além disso, o tamanho dos produtos obtidos está de acordo com aquele previsto pela distância entre as regiões de hibridização dos oligonucleotídeos nos cDNAs de Bdh-1, Bdh-2 e Bdh-3. É possível inferir, ainda, pela intensidade das bandas marcadas, o mais alto nível de transcrição de Bdh-2 em VS, comparada às demais bodesinas.

Quanto à investigação da especificidade dos oligonucleotídeos, os valores de Ct obtidos foram mais baixos ($p < 0,05$) nas reações de pBDH-1 com BDH-SE/BDH-AS1, do que com BDH-SE/BDH-AS2 ou com BDH-SE/BDH-AS3. De modo semelhante, o valor de Ct para pBDH-2 com BDH-SE/BDH-AS2 foi significativamente inferior ($p < 0,05$) àquele com BDH-SE/BDH-AS1 ou com BDH-SE/BDH-AS3. A mesma analogia pôde ser feita para as amplificações com pBDH-3 e BDH-SE/BDH-AS3, comparada aos demais pares de oligonucleotídeos. Tal fato indica que a amplificação de cada bodesina com seu respectivo par de oligonucleotídeos é significativamente favorecida quando comparada às amplificações cruzadas.

Em muitos estudos da expressão de genes por qPCR, os valores de Ct para uma amostra têm sido relacionados aos valores de Ct para amostras-padrão contendo quantidades conhecidas de DNA purificado (OVERBERGH *et al.*, 1999). Adicionalmente, a normalização dos valores obtidos em relação à quantidade inicial de RNA total na reação corrige alguns erros inerentes à experimentação, melhorando a qualidade dos cálculos (BUSTIN *et al.*, 2000). A quantificação absoluta das bodesinas em vesícula seminal indicou que Bdh-2 é a isoforma predominante no tecido. O número de transcritos que codificam Bdh-2 em VS 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 a Bdh-1. Diferentes níveis de transcrição de mRNA codificando as isoformas de bodesinas poderiam indicar o desempenho de distintas funções pelas mesmas. As diversas isoformas de espermadesinas suínas, até então descritas, são oriundas de modificações

pós-traducionais, como acetilação (SANZ *et al.*, 1992) e N-glicosilação (CALVETE *et al.*, 1995). Tais modificações afetam fortemente as propriedades bioquímicas dessas moléculas, e conseqüentemente, o desempenho de suas funções biológicas (CALVETE *et al.*, 1993). IWAMOTO *et al.* (1995) purificaram diversas isoformas de SPMI (AQN-3) a partir do plasma seminal de suíno. Assim como nas bodesinas (presente estudo), esses polipeptídeos heterólogos diferiram entre si em um ou dois resíduos de aminoácidos. No entanto, diferentemente dos nossos resultados, os autores descreveram somente um cDNA para as isoformas de SPMI, obtido a partir do mRNA de vesícula seminal.

Nas curvas de Ct *versus* concentração de DNA, plotadas para as bodesinas em vesícula seminal ou em plasmídeo, todos os valores de R^2 foram maiores do que 0,97. A exceção ocorreu para a amplificação de Bdh-3 com cDNA de VS ($R^2 = 0,78$). De acordo com PFAFFL (2001), valores de $R^2 > 0,90$ para PCR em tempo real indicam uma ótima linearidade entre os parâmetros. Já os valores de E variaram de 0,99 a 1,46, com exceção da amplificação de Bdh-2 com cDNA de VS ($E = 2,52$). Os valores ideais de E (eficiência) encontram-se próximos à unidade ($E = 1$) e podem ser calculados através de diluições seriadas do DNA. Esse valor corresponde ao percentual de eficiência das reações de PCR em tempo real (STHALBERG *et al.*, 2003). Uma significativa inibição do PCR nas amostras biológicas foi evidente a partir dos melhores valores de E obtidos para os plasmídeos purificados (0,99 a 1,14), comparado com o cDNA de VS (1,23 a 2,52). Adicionalmente, as comparações entre os valores de E para amplificações a partir de cDNA de VS indicaram que podem existir fatores na amostra interferindo predominantemente com PCR de Bdh-2. Tal fato pôde ser constatado pela semelhança entre as eficiências dos PCRs de todas bodesinas nas amostras de plasmídios purificados. No presente estudo, nós não investigamos a causa dessa inibição. O grau de inibição de um PCR pode depender de fatores como tamanho, seqüência e estrutura terciária do DNA, bem como do tamanho e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados (STHALBERG *et al.*, 2003). Em se tratando de uma mesma amostra de DNA e de oligonucleotídeos muito semelhantes, como ocorre no presente trabalho, esses fatores podem ser praticamente descartados.

Um procedimento comum para corrigir as diferenças nas eficiências entre duas amostras de origens distintas é a amplificação de um gene de referência (BUSTIN *et al.*, 2000). Assim, para quantificação das bodesinas em TS, BU e EP, relativo a VS, nós realizamos, além das amplificações dos genes de interesse, PCR de dois *house-keeping*

genes, β -actina e β -globina. A quantidade de transcritos determinada por normalização com β -globina (Bdh1-G, Bdh2-G e Bdh3-G) foi sempre superior àquela obtida após normalização com β -actina (Bdh1-A, Bdh2-A e Bdh3-A). Os valores calculados para as três bodesinas em BU e TS, após normalização com β -globina, foram cerca de 25 e 100 vezes superiores àqueles com β -actina, respectivamente. Enquanto que em EP, ambas as normalizações produziram valores muito semelhantes entre si, para as três bodesinas. A escolha adequada do gene de referência é um fator extremamente importante na quantificação de um gene de interesse, pois parte-se do pressuposto que a expressão do gene de referência seja constante entre as amostras (STHALBERG et al, 2003). Assim, é provável que o nível de expressão de β -actina e β -globina em VS seja mais semelhante àquele em EP do que nos demais tecidos estudados.

No presente trabalho foi possível verificar que o nível de transcrição de todas as bodesinas é significativamente superior em vesícula seminal, comparado aos demais tecidos. Esse resultado foi obtido com valores de Ct normalizados para ambos os genes de referência, β -actina e β -globina. Estudos preliminares na espécie indicaram a vesícula seminal como o principal local de produção das bodesinas (MELO *et al.*, 2007). Estudos na espécie suína têm demonstrado que vesícula seminal também é a principal fonte produtora das espermadesinas, embora outros tecidos reprodutivos também produzam essas moléculas (KWOK *et al.*, 1993; DOSTÀLOVÀ et al, 1994; SINOWATZ *et al.*, 1995).

Apesar dos baixos níveis de transcrição encontrados nos tecidos do trato reprodutor, exceto VS, o uso de um método mais sensível, como PCR em tempo real, permitiu a detecção das três bodesinas em testículo, glândula bulbo-uretral, bem como em epidídimo. Assim, de acordo com as quantificações normalizadas com β -actina, VS apresenta cerca de 85 mil vezes mais transcritos de Bdh-1 do que TS, 200 mil vezes mais do que EP e 500 mil vezes mais do que BU. Analogia semelhante pode ser traçada para as bodesinas 2 e 3, bem como para os valores obtidos a partir da normalização com β -globina.

Dando suporte aos nossos resultados, abordagens investigativas através de RT-PCR, *Western blot* e imunohistoquímica têm identificado a presença das espermadesinas suínas em próstata, vesícula seminal, epidídimo e testículo (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002). Similar ao presente estudo, as espermadesinas AWN suína e HSP-7 eqüina têm sido identificadas em vesícula seminal e epidídimo (REINERT *et*

al., 1997; HOSHIBA & SINOWATZ, 1998; EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002). Em contraste à AWN, as bodesinas, bem como HSP-7, foram encontradas em testículo. Os resultados do presente estudo mostram claramente a expressão das espermadésinas em glândula bulbo-uretal, corroborando os estudos preliminares na espécie (MELO *et al.*, 2007). Adicionalmente, em nenhuma outra espécie animal, foi relatada a presença de espermadésina em BU. Isso poderia indicar diferentes padrões de expressão de proteínas homólogas em diferentes espécies de mamíferos.

As modernas técnicas de biologia molecular têm permitido investigações cada vez mais sensíveis a acuradas acerca da distribuição e quantificação de diversas biomoléculas nos diferentes tecidos. Dessa forma, transcritos de espermadésinas, antes consideradas moléculas exclusivas do trato reprodutor masculino, já foram encontrados no útero e na junção útero-tubárica da fêmea suína (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2002).

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo relatando o perfil de transcrição dos genes das espermadésinas caprinas (bodesinas) ao longo do trato reprodutor masculino, utilizando qRT-PCR em tempo real. Dentre os principais órgãos, glândulas e ductos do trato reprodutor do bode, a vesícula seminal apresentou-se como o principal local de produção das bodesinas. Experimentos adicionais são necessários para caracterizar as funções particulares de cada uma das isoformas das bodesinas nos diferentes tecidos para aumentar nossos conhecimentos acerca dos mecanismos reprodutivos na espécie.

5. Referências bibliográficas

ASHDOWN, R.R., DONE, S. Color Atlas of Veterinary Anatomy: The Ruminants. Barcelona: C.V. Mosby. p 1–35, 2003.

BERGERON, A., VILLEMURE, M., LAZURE, C., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* v.71, p.461–470, 2005.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, v.29, p.23-39, 2002.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* v.25, p.169–193, 2000.

CALVETE, J.J., SOLIS, D., SANZ, L., DIAZ-MAURINO, T., SCHAFER, W., MANN, K., TOPFER-PETERSEN, E. Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *Eur. J. Biochem.*, v.1; p.719-725, 1993.

CALVETE, J.J., MANN, K.M., 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.*, v. 365, p. 179-182, 1995.

DOSTÁLOVÁ, Z., CALVETE, J.J., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* v.200, p.48-54, 1994.

DUSSAULT, A.A., POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol. Proced. Online.* v.8, p.1-10, 2006.

EKHLASI-HUNDRIESER, M., SINOWATZ, F., GREISER, D.E., 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.

EKHLASI-HUNDRIESER, M., SCHAFER, B., PHILIPP, U., KUIPER, H., LEEB, T., MEHTA, M., KIRCHHOFF, C., TÖPFER-PETERSEN E. Sperm-binding fibronectin type II-module proteins are genetically linked and functionally related. *Gene*, v.392, p.253-265, 2007.

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.

IWAMOTO, T., HIROAKI, H., FURUICHI, Y., WADA, K., SATOH, M., SATOH, M., OSADA, T., GAGNON, C. Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Lett.*, v. 368, p. 420-424, 1995.

KONIG, H.E., LIEBICH, H.G. Anatomia dos Animais Domésticos: Órgãos e Sistemas. Porto Alegre, Artmed, p.127-129, 2004.

KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STAHLBERG, A., ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspec. Med.*, v.27, p.95-125, 2006.

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, 1993.

MELO, L.M., TEIXEIRA, D.I.A., HAVT, A., CUNHA, R.M.S., MARTINS, D.B.G., CASTELLETTI, C.H.M., SOUZA, P.R.E., LIMA FILHA, 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. Dev.*, in press, 2007.

OVERBERGH, L., VALCKX, D., WAER, M., MATHIEU, C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*, v. 11, p. 305-312, 1999.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nuc. Acid. Res.*, v.29, p.2002-2007, 2001.

PFAFFL, M.W., HORGAN, G.W., DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acid. Res.*, v.30, E36, 2002.

REINERT, M., CALVETE, J.J., 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*, v.29, p.179–186, 1997.

SANZ, L., CALVETE, J.J., MANN, K., SCHAFER, W., SCHMID, E.R., TÖPFER-PETERSEN, E. The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. *Eur. J. Biochem.*, v.205, p.645–652, 1992.

SINOWATZ, F., AMSELGRUBER, W., TOPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J., SANZ, L., PLENDL, J. Immunohistochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract. *Cell Tissue Res.*, v.282, p.175–179, 1995.

STHALBERG, P. ÅMAN, B. RIDELL, P. MOSTAD, M. KUBISTA Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of κ and λ immunoglobulin light chain expression. *Clin. Chem.*, v.49, p.51–59, 2003.

SOLIS, D., ROMERO, A., JIMENEZ, M., DIAZ-MAURINO, T., CALVETE, J.J. Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. *FEBS Lett.*, v.431, p.273–278, 1998.

TEDESCHI, G., OUNGRE, E., MORTARINO, M., NEGRI, 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 JR, C., 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.9, 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 isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gen. Mol. Res.*, v.5, p.79–87, 2006.

TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reprod. Update*, v.5, p.314-329, 1999.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., KIRCHHOFF, C., LEEB, T., SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.159–170, 2005a.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., TSOLOVA, M., LEEB, T., KIRCHHOFF, C., MULLER, P. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia*, v.37, p.202-204, 2005b.

VARELA, P.F., ROMERO, A., SANZ, L., ROMÃO, M.J., TÖPFER-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.

VAN ZUTPHEN, L.F.M., BALLS, M. *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Amsterdam: Elsevier Science. p. 1–1260, 2001.

WEMPE, F., EINSPANIER, R., SCHEIT, K.H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 183, p.232–237, 1992.

CAPÍTULO IV: ANEXOS



ANEXO 1:

Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family.

Molecular Reproduction and Development, v.75, p.8-16, 2008

Buck (*Capra hircus*) Genes Encode New Members of the Spermadhesin Family

LUCIANA MAGALHÃES MELO,¹ DÁRCIO ÍTALO ALVES TEIXEIRA,² ALEXANDRE HAVT,¹ RODRIGO MARANGUAPE SILVA DA CUNHA,³ DANYELLY BRUNESKA GONDIM MARTINS,⁴ CARLOS HENRIQUE MADEIROS CASTELLETTI,⁴ PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE SOUZA,⁴ JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO,⁴ VICENTE JOSÉ DE FIGUEIRÊDO FREITAS,² BENILDO SOUSA CAVADA,^{1*} AND GANDHI RÁDIS-BAPTISTA^{4**}

¹Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas—Biomol-Lab., Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Avenida Humberto Monte s/n, bloco 907, sala 1075, Campus do Pici, Fortaleza-CE, Brazil

²Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução—LFCR, State University of Ceará, Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE, Brazil

³Núcleo de Biotecnologia de Sobral—NUBIS, State University of Vale do Acaraú, Rua Gerardo Rangel s/n, Campus do Derby, Sobral-CE, Brazil

⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami—LIKA, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife—PE, Brazil

ABSTRACT Spermadhesins are the major proteins of boar seminal plasma and form a group of polypeptides probably involved in reproduction. In previous work, a member of the spermadhesin family from buck seminal plasma, called BSFP, was characterized by mass spectrometry and N-terminal sequencing. The present study aimed to clone and characterize the BSFP gene and investigate its expression along the genital tract using real-time polymerase chain reaction (PCR). The cDNAs of the seminal vesicle, testis, epididymis, bulbourethral gland, and ductus deferens were prepared from a buck. Following 3'- and 5'-end amplifications using seminal vesicle cDNA, we cloned and sequenced four highly similar (97–98%) nucleotide sequences encoding spermadhesins, which were named Bodhesin-1 (Bdh-1), Bdh-2, Bdh-3, and Bdh-4. All deduced amino acid sequences contained the CUB domain signature and were 49–52% similar to boar AWN. Among the four Bdh amino acid sequences, Bdh-2 was the most similar to the BSFP N-terminal fragment. By using real-time PCR, it was verified specific amplifications for all Bdh in the seminal vesicle, testis, epididymis, and bulbourethral gland, with the exception of Bdh-2 in epididymis. The amplicons had a melting temperature and size of approximately 78°C and 130 bp, respectively. Bdh expression was higher in the seminal vesicle when compared to the other tissues. The present work confirms that goat is the fifth mammalian species, after pig, cattle, horse, and sheep, in which spermadhesin molecules are found. To the best of our knowledge, this is the first report on buck spermadhesin genes using molecular cloning and expression profile. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 8–16, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key Words: spermadhesin; gene; seminal vesicle; buck; *Capra hircus*; bodhesin

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 (Thibault and Fournier-Delpech, 1993). The protein composition of seminal plasma varies from species to species. These components have important effects on sperm function, influencing the fertilizing ability of spermatozoa, and exert effects on female reproductive physiology (Töpfer-Petersen et al., 2005). 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 (Töpfer-Petersen et al., 1998), which are able to interact with some sugar-containing receptors on cell surfaces. The capacity to bind to sugar moieties is a biological activity characteristic of lectins and lectin-like proteins. All animal lectins contain a carbohydrate-recognition domain (CRD) in their amino acid sequence. However, spermadhesins differ structurally from the majority of lectins. They show a distinct protein domain called

Grant sponsor: CAPES, Brazil; Grant sponsor: CNPq, Brazil; Grant sponsor: FUNCAP, Brazil.

*Correspondence to: Benildo Sousa Cavada, Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas—Biomol-Lab., Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Avenida Humberto Monte s/n, bloco 907, sala 1075, Campus do Pici, Fortaleza-CE, Brazil. E-mail: bscavada@ufc.br

**Correspondence to: Gandhi Rádis-Baptista, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami—LIKA, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife—PE, Brazil. E-mail: radisbra@ufpe.br

Received 26 December 2006; Accepted 14 March 2007

Published online 30 May 2007 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/mrd.20757

CUB (Bork and Beckmann, 1993), a widespread 110-amino acid module, which was named after structural analysis of three proteins in which the CUB domain was first identified (complement subcomponents—C1r/C1s, embryonic sea urchin protein—Uegf, and bone morphogenetic protein 1—Bmp1). This domain consists of a sandwich made up of two sheets, each containing four anti-parallel strands and one parallel strand (Romero et al., 1997; Romão et al., 1997; Varela et al., 1997).

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 PSP-II (Calvete et al., 1995; Varela et al., 1997). Another spermadhesin, homologous to AWN, was described in horse and designated HSP-7, which attaches to the sperm surface at the time of ejaculation (Reinert et al., 1997). Studies in bull have demonstrated the presence of the spermadhesin aSFP which seems to be a growth factor with effects on ovarian cells (Wempe et al., 1992), and Z13 which shows 50% similarity with PSP-I (Tedeschi et al., 2000). Recently, Bergeron et al. (2005) purified a 15.5 kDa protein from ram seminal plasma (RSP) that was identified as a spermadhesin by N-terminal sequencing. In two earlier works, we reported the N-terminal of a member of the spermadhesin family from buck seminal plasma, BSFP (buck seminal fluid protein). This protein is homologous to AWN, AQN-1, and HSP-7 (Teixeira et al., 2002, 2006).

Only after the above proteins had been described, some spermadhesin cDNAs were cloned (Wempe et al., 1992; Kwok et al., 1993; Ekhlasi-Hundrieser et al., 2002). However, buck spermadhesin genes were still unknown. The objective of this work was to clone and characterize buck spermadhesin genes and investigate their pattern of expression along the male genital tract.

MATERIALS AND METHODS

Animal Tissues and Total RNA Isolation

Distinct male reproductive tissues such as the seminal vesicle, testis, epididymis, bulbourethral gland, and ductus deferens were excised from a single sexually mature buck (*Capra hircus*) of an undefined breed. The animal was anesthetized and sacrificed according to the guidelines of animal care (Van Zutphen and Balls, 1997). The tissues were accessed by a surgical procedure following their anatomic location (Ashdown and Done, 2003). After collection, the tissues were kept in liquid nitrogen until total RNA isolation. In order to identify and characterize the cDNA encoding buck spermadhesin, we performed total RNA and mRNA isolation of seminal vesicle. For gene expression analysis, by real-time polymerase chain reaction (PCR), we used only total RNA of all the tissues described above.

Total RNA was isolated using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Briefly, the frozen tissues were ground into powder and added to the Trizol reagent. After sample homogenization, the organic and aqueous phases were

separated and total RNA was precipitated with isopropyl alcohol. The RNA pellets were washed with 70% ethanol, air-dried, and dissolved in RNase-free water.

Seminal Vesicle mRNA Isolation

Poly(A⁺)-RNA was obtained from total RNA by affinity chromatography on oligo(dT) cellulose, using an mRNA purification kit (Invitrogen). The yield and quality of total RNA and mRNA were determined spectrophotometrically using 260 and 260/280 nm ratio, respectively. Following the isolation of seminal vesicle mRNA, we proceeded with 3'- and 5'-end cDNA amplification.

3'-End Amplification of Spermadhesin cDNAs

First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription coupled to RT-PCR using a 3'-adaptor-Oligo(dT)18 (Clontech, Mountain View, CA), 0.6 µg of mRNA and 50 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase—(M-MLV RT) purchased from Promega (Madison, WI). The 3'-rapid amplification of cDNA end (3'-RACE) was achieved with 30 cycles of PCR. We used a specific sense primer called SMD-SE (Table 1), designed based on a homologous region of boar and stallion spermadhesin nucleotide and amino acid sequences, as well as buck spermadhesin N-terminal sequence (Teixeira et al., 2002). The antisense primer was complementary to QT and was purchased as Q0 from Clontech. The products were separated on a 1% agarose gel, stained with 0.5 µg/ml of ethidium bromide, and visualized with an UV transilluminator.

cDNA Cloning

Subcloning of spermadhesin genes was performed with the pGEM-T Easy Vector System (Promega). *Escherichia coli* JM109 (Promega) was transformed with subcloned products using the calcium chloride method. Briefly, cells were concentrated by centrifugation and resuspended in a solution containing calcium chloride. Competent cells were mixed with the recombinant plasmid DNA and then transformed with heat shock. The cells were grown in a nonselective medium and plated on ampicillin-containing medium. Plasmid extraction and purification was carried out following the manufacturer's instructions of the GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Purified plasmids were spectrophotometrically quantified.

TABLE 1. Specific Primers Used for 3'-RACE, 5'-RACE, and Real-Time PCR of Bdh

Name	Nucleotide sequence
SMD-SE	5'-TGTGGGGGSGTCCWCAGA-3'
SMD-AS	5'-TCACTAAGCTKYTGACGC-3'
BDH-SE	5'-TGGACCATCCTCTTGAAGA-3'
BDH-AS1	5'-CTGAACAGAGCCTCCCAA-3'
BDH-AS2	5'-CTGAACAGAACCTCCCAA-3'
BDH-AS3	5'-CTGAACAGAACTTCCCAA-3'

cDNA Sequencing and Sequence Analysis

The candidate clones were sequenced using the insert-flanking sense primers M13F or T7 and antisense primers M13R or SP6 purchased from Clontech. Nucleotide sequencing was performed using Dye terminator chemistry (DYEnamic ET Dye Terminator kit) on MegaBACE 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 after FredFrap analysis. Database searches for related genes were conducted using BLAST (Altschul et al., 1990) at the National Center for Biotechnological Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5'-End Amplification of Spermadhesin cDNAs

For 5'-RACE, a specific antisense primer called SMD-AS, specific for the 3'-end coding region of buck spermadhesin cDNA, was synthesized (Table 1), 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). 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.

Similarity Search and Sequence Comparison

The 3'- and 5'-end sequences were aligned and their homology relationship was performed using ClustalW (Higgins et al., 1994), available at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>).

The predicted amino acid sequences of buck spermadhesin cDNAs were compared against the protein sequence databank at NCBI using BLASTP (Altschul et al., 1997). Some sequences were chosen as the best score after alignment, and they were used to identify conserved residues in homologous sequences. Mammalian spermadhesin sequences from *Sus Scrofa* (CAI05910, CAI05911, CAI05914), *Equus caballus* (P80720), and *Bos taurus* (AAA30745) were also aligned using ClustalW (Higgins et al., 1994).

Gene Expression Analysis Using Real-Time PCR

First-strand cDNA synthesis was performed for all collected tissues using 1.2 µg of total RNA, 500 ng/µl of 3'-adaptor-Oligo(dT)18 (Promega) and 100 units of Superscript III H⁻ (Invitrogen) in a total volume of 25 µl. The cDNA samples of each reproductive tissue were diluted, yielding cDNA synthesized from 48 to 0.48 ng of

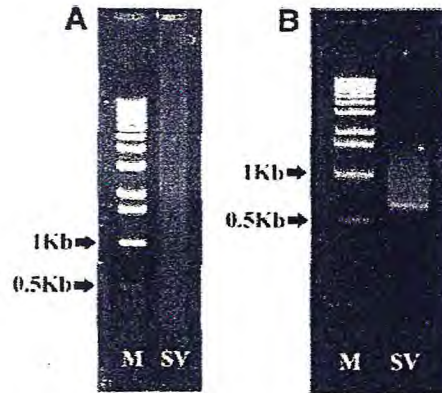


Fig. 1. A: Electrophoretic analysis of RT-PCR synthesized cDNA of seminal vesicle (SV). B: Amplification of Bdh cDNA 3'-end using primers Q0 and SMD-SE.

total RNA per µl. Specific primers were used (Table 1) that were synthesized based on buck spermadhesin cDNAs sequences: one sense (BDH-SE) and three antisense primers (BDH-AS1, BDH-AS2, and BDH-AS3). In order to verify the possible amplifications of buck spermadhesin genes, we tested each antisense BDH primer with the common sense primer BDH-SE.

Amplification of buck spermadhesin cDNA was carried out in a Rotor-Gene 3000 operated with the respective Rotor Gene software version 6.0.19 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Each reaction consisted of: 7.2 ng cDNA, 500 nM of primers, 10 µl of SYBR Green PCR Core Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA), in a reaction volume of 20 µl. Amplification conditions were as follows: 95°C (30 sec), 55°C (30 sec), 72°C (20 sec) in 45 repetitions. Specificity of each reaction was ascertained after completion of the amplification protocol. This was achieved by performing the melting procedure (55–90°C; 1°C/5 sec). Messenger RNA levels among Bdh-1, Bdh-2, and Bdh-3 were compared using the formula described by Dussault and Pouliot (2006), where Bdh-1 was set as the reference gene.

RESULTS

Synthesis, Amplification, and Sequencing of cDNAs

Reverse-transcription coupled to RT-PCR, using a Qt-adaptor protocol, allowed the isolation of full-length spermadhesin cDNA molecules (Fig. 1A). Using primers Q0 and SMD-SE, we could detect an apparent single band of approximately 700 base pairs (bp) in the seminal vesicle (Fig. 1B).

After 3'- and 5'-RACE amplifications, buck spermadhesin cDNAs were isolated by screening 73 recombinant

Fig. 2. Nucleotide sequences of cDNAs encoding four spermadhesin isoforms named Bdh-1, Bdh-2, Bdh-3, and Bdh-4. Nucleotides that could translate into variable amino acid residues are enclosed in grey boxes. Underlined letters: regions to specific primers, called SMD-SE and SMD-AS, used for 3' and 5'-amplifications, respectively. Letters with double underline: sequence encoding signal peptide. Bold letters: sequence encoding Bdh-4 N-terminus. Italic-bold letters: polyadenylation signal.

BUCK SPERMADHESIN GENES 11

Bdh-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
Bdh-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
Bdh-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
Bdh-4	GCN	NAC	GTG	TTT	GTA	TCT	TGT	ACG	TGG	GCC	CGG	TGN	GNC	GGN	TGC	TGA	GGC	TGG	TGC	CAG	60
Bdh-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bdh-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bdh-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bdh-4	GCT	GCG	AAG	ATG	AAG	CTG	TCC	AGC	GTC	ATC	CCT	TGG	GCC	TTG	CTG	CTC	AGC	ACA	GCC	ACA	120
Bdh-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	TGT	GGG	GGG	GTC	CAC	AGA	GAC	TTC	---
Bdh-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	TGT	GGG	GGG	GTC	CAC	AGA	GAC	TTC	---
Bdh-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	TGT	GGG	GGC	GTC	CAC	AGA	GAC	TTC	---
Bdh-4	CTG	GTT	TCA	ACA	GAA	TCG	GAT	GAA	GAC	ACT	AGA	AAA	TGT	GGG	GGC	GTC	CAC	AGA	GAC	TTC	180
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***	**	***	* * *	***	***	***	---
Bdh-1	TCT	GGG	AGG	ATC	TCC	AGC	AGT	TTC	TCA	TGG	GGG	CCA	AAG	TGT	ACC	TGG	ACC	ATC	CTC	TTG	---
Bdh-2	TCT	GGG	AGG	ATC	TCC	AGC	AGT	TTC	TCA	TGG	GGG	CCA	AAG	TGT	ACC	TGG	ACC	ATC	CTC	TTG	---
Bdh-3	TCT	GGG	AGG	ATC	TCC	AGC	AGT	TTC	TCA	TGG	GGG	CCA	AAG	TGT	ACC	TGG	ACC	ATC	CTC	TTG	---
Bdh-4	TCT	GGG	AGG	ATC	TCC	AGC	AGT	TTC	TCA	TGG	GGG	CCA	AAG	TGT	ACC	TGG	ACC	ATC	CTC	TTG	240
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Bdh-1	AAG	AGC	GGT	TAT	ACA	GTT	GTA	CTG	ACA	ATT	CCA	TTT	CTC	AGC	CTC	AAC	TGT	AAT	GAA	GAG	---
Bdh-2	AAG	AGC	GGT	TAT	ACA	GTT	GTA	CTG	ACA	ATT	CCA	TTT	CTC	AGC	CTC	AAC	TGT	AAT	GAA	GAG	---
Bdh-3	AAG	AGC	GGT	TAT	ACA	GTT	GTA	CTG	ACA	ATT	CCA	TTT	CTC	AGC	CTC	AAC	TGT	AAT	GAA	GAG	---
Bdh-4	AAG	AGC	GGT	TAT	ACA	GTT	GTA	CTG	ACA	ATT	CCA	TTT	CTC	AGC	CTC	AAC	TGT	AAT	GAA	GAG	300
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Bdh-1	GAT	GTG	GAA	ATC	ATA	GAC	GGG	CTG	CCA	GAC	AGT	ACT	ACA	TTT	GGG	AGG	CTC	TGT	TCA	GGG	---
Bdh-2	GAT	GTG	GAA	ATC	ATA	GAC	GGG	CTG	CCA	GAC	AGT	ACT	ACA	TTT	GGG	AGG	CTC	TGT	TCA	GGG	---
Bdh-3	GAT	GTG	GAA	ATC	ATA	GAC	GGG	CTG	CCA	GAC	AGT	ACT	ACA	TTT	GGG	AGG	CTC	TGT	TCA	GGG	---
Bdh-4	GAT	GTG	GAA	ATC	ATA	GAC	GGG	CTG	CCA	GAC	AGT	ACT	ACA	TTT	GGG	AGG	CTC	TGT	TCA	GGG	360
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Bdh-1	GGA	CCC	CTG	GTG	TTT	AAA	TCT	TCT	TCC	AAT	GTC	ATG	ACC	GTG	AAA	TAC	TAC	AGA	AGT	TCC	---
Bdh-2	GGA	CCC	CTG	GTG	TTT	AAA	TCT	TCT	TCC	AAT	GTC	ATG	ACC	GTG	AAA	TAC	TAC	AGA	AGT	TCC	---
Bdh-3	GGA	CCC	CTG	GTG	TTT	AAA	TCT	TCT	TCC	AAT	GTC	ATG	ACC	GTG	AAA	TAC	TAC	AGA	AGT	TCC	---
Bdh-4	GGA	CCC	CTG	GTG	TTT	AAA	TCT	TCT	TCC	AAT	GTC	ATG	ACC	GTG	AAA	TAC	TAC	AGA	AGT	TCC	420
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Bdh-1	AAC	CAG	CCA	GTA	TCT	CCT	TTT	GAT	ATA	TTT	TAC	TAC	GAG	CGT	CCA	CAA	GCT	TAG	TGA	TCG	---
Bdh-2	AAC	CAG	CCA	GTA	TCT	CCT	TTT	GAT	ATA	TTT	TAC	TAC	GAG	CGT	CCA	CAA	GCT	TAG	TGA	TCA	---
Bdh-3	AAC	CAG	CCA	GTA	TCT	CCT	TTT	GAT	ATA	TTT	TAC	TAC	GAG	CGT	CCA	CAA	GCT	TAG	TGA	TCG	---
Bdh-4	AAC	CAG	CCA	GTA	TCT	CCT	TTT	GAT	ATA	TTT	TAC	TAC	GAG	CGT	CCA	CAA	GCT	TAG	TGA	TCG	480
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Bdh-1	TGC	TCA	CAC	CTA	AGA	GTG	GAC	AAG	TGT	TGC	CGA	TGA	AAA	CAA	TCT	TCC	TGG	AAG	ACT	CTT	---
Bdh-2	TGC	TCA	CAC	CTA	AGA	GTG	GAC	AAG	TGT	TGC	CGA	TGA	AAA	CAA	TCT	TCC	TGG	AAG	ACT	CTT	---
Bdh-3	TGC	TCA	CAC	CTA	AGA	GTG	GAC	AAG	TGT	TGC	CGA	TGA	AAA	CAA	TCT	TCC	TGG	AAG	ACT	CCT	---
Bdh-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	540
Bdh-1	CTG	GAA	CCA	GCT	GAC	CAC	GAG	GAG	GSA	CAC	ATC	TTG	STC	ACC	TGT	CTG	ATC	ACA	CCT	GCC	---
Bdh-2	CTG	GAA	CCA	GCT	GAC	CAC	GAG	GAG	GSA	CAC	ATC	TTG	STC	ACC	TGT	CTG	ATC	ACA	CCT	GCC	---
Bdh-3	CTG	GAA	CCA	GCT	GAC	CAC	GAG	GAG	GSA	CAC	ATC	TTG	STC	ACC	TGT	CTG	ATC	ACA	CCT	GCC	---
Bdh-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	600
Bdh-1	CAT	CCC	ATC	CCG	TCT	CCT	CCA	TTT	TTT	CCA	GCC	TTT	TGT	CTC	TTC	CCT	GCA	AAG	GAA	GAT	---
Bdh-2	CAT	CCC	ATC	CCG	TCT	CCT	CCA	TTT	TTT	CCA	GCC	TTT	TGT	CTC	TTC	CCT	GCA	AAG	GAA	GAT	---
Bdh-3	CAT	CCC	ATC	CCG	TCT	CCT	CCA	TTT	TTT	CCA	GCC	TTT	TGT	CTC	TTC	CCT	GCA	AAG	GAA	GAT	---
Bdh-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	660
Bdh-1	TGC	TTA	CTC	CTG	AGT	GTT	CGA	TAC	TTG	GCC	GGT	CTT	GCG	GTT	CGG	TCA	TTT	CGC	TTG	TCT	---
Bdh-2	TGC	TTA	CTC	CTG	AGT	GTT	CGA	TAC	TTG	-CC	GGT	CTT	GCG	GTT	CGG	TCA	TTT	CGC	TTG	TCT	---
Bdh-3	TGC	TTA	CTC	CTG	AGT	GTT	CGA	TAC	TTG	-CC	GGT	CTT	GCG	GTT	CGG	TCA	TTT	CGC	TTG	TCT	---
Bdh-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	720
Bdh-1	TTA	TAA	TCA	TTT	TGA	ATA	AAG	TCT	CTT	TAC	CTG	AAA	AAA	AAA	AA						---
Bdh-2	TTA	TAA	TCA	TTT	TGA	ATA	AAG	TCT	CTT	TAC	CTG	AAA	AAA	AAA	AA						---
Bdh-3	T-A	TAA	TCA	TTT	TGA	ATA	AAG	TCT	CTT	TAC	CTG	AAA	AAA	AAA	AA						764
Bdh-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 2.

TABLE 2. Spermadhesin cDNAs

	5'-UTR	ORF	3'-UTR	Encoded protein (aa)	cDNA accession	Reference
Bdh-1	69 ^a	405 ^a	279	134 ^a	DQ204877	Present study
Bdh-2	69 ^a	405 ^a	278	134 ^a	EF157969	Present study
Bdh-3	69 ^a	405 ^a	277	134 ^a	EF157970	Present study
Bdh-4	69	405	—	134	EF157971	Present study
AWN	29	465	217	154	AJ853850	Haase et al., 2005
AQN-1	29/31	399	250/276 ^b	132	AJ853854 AJ853855	Haase et al., 2005
aSFP	29 ^c	405	252	134	M84603	Wempe et al., 1992
AQN-3	29	414	266	137	AJ853851	Haase et al., 2005

^aInferred by comparison to the Bdh-4 gene sequence for which experimental evidence was available.

^bTwo alternative splice variants of AQN-1 exist.

^cThe transcription start sites of the bovine genes were inferred by comparison of the bovine genomic sequences to the porcine genomic sequences for which experimental evidence was available.

bacterial clones by PCR using the insert-flanking primers M13R and M13F. Analysis of nucleotide sequences from 39 recombinant clones revealed four different cDNAs (Fig. 2) that could encode four spermadhesins, named Bdh-1, Bdh-2, Bdh-3, and Bdh-4. Bdh-1, -2, and -3 clones contained inserted cDNAs ranging from 606 to 608 bp.

Bdh-4 cDNA, which was discovered later after Bdh-1, -2, and -3, was shown to consist of 477 nucleotides. Bdh mRNAs comprised a 405-nucleotide open reading frame (bases 70–474) including the stop-codon (Fig. 2). Particularly, all four cDNAs were terminated by two consecutive stop-codons (TAGTGA). The 5'-untranslated region (5'-UTR), shown in the Bdh-4 clone, is approximately 69 bp long (Table 2) followed by a signal peptide from bases 70 to 132. The 3'-UTR of Bdh-1–3 is approximately 278 bp long and contains the consensual polyadenylation signal (AATAAA), that is only 13 bp upstream of the poly(A) tail.

Sequence Comparison

The encoded proteins deduced from Bdh-4 cDNA contained 134 amino acid residues including a 21-amino acid signal peptide. This signal peptide comprised a sequence identity ranging from 80 to 90% compared to other spermadhesins (Fig. 3A).

The analysis of the primary structure of all four deduced mature Bdh showed a conserved region that predicts a single CUB domain (Fig. 3B), a typical feature of the spermadhesin family members (Varela et al., 1997). The similarities among Bdh isoforms -1, -2, -3, and -4 ranged from 97 to 98%, calculated by ClustalW with default parameters. Bdh-2 and -4 contained a His13 instead of Leu13 when compared to the other Bdh (see the boxes in Fig. 3B). Additionally, Bdh-2 and -4 showed a Ser112 or Thr112, respectively. However, Bdh-1 and -3 had a glutamine at this position. Furthermore, Bdh-3 showed a lysine residue substituting for an arginine in Bdh-1, -2, and -4 at position 72. Finally, Bdh-1 showed a leucine at position 73 while the other Bdh had a phenylalanine. Other nucleotide differences were seen among the Bdh cDNAs, but they did not encode different amino acid residues or they were located in the 3'-UTR.

Comparison of the predicted amino acid sequence of the mature Bdh-4 against the protein sequence database at NCBI revealed similarities with other spermadhesins. The sequences with the highest similarities (36–46%) were aligned and used to identify conserved residues in homologous sequences (Fig. 3B). The highest identity was seen with boar AWN (46%). However, when we compared the whole amino acid sequence, similarity increased to 52% with AWN and AQN-1. The predicted amino acid sequences of Bdh-1, -2, and -3 shared 50, 49, and 51% similarity with AWN, respectively.

Expression of Bdh Genes in the Buck Genital Tract

After PCR amplifications of seminal vesicle cDNA (4.8 ng/μl of total RNA), using specific primers for Bdh-1, -2, and -3, we observed products with a melting temperature (T_m) ranging from 77.96 to 78.14°C (Table 3) and the expected size of approximately 130 bp (Fig. 4). To obtain these products, we performed approximately 25 cycles (Table 3). Adapting the formula described by Dussault and Pouliot (2006), the seminal vesicle expression levels of Bdh-2 and -3 mRNAs were 6.71 and 3.76 times higher than that of Bdh-1, respectively.

Using the same set of primers, but different tissues (testis, epididymis, bulbourethral gland), we noticed amplifications for all the different Bdh, with the exception of Bdh-2 which could not be detected in epididymis. In addition, no amplicons were obtained for ductus deferens. The observed products were approximately 130 bp long (Fig. 4) with an average T_m ranging from 78.31 to 78.53°C (Table 4). However, unlike with seminal vesicle, we needed an amount 10-fold greater of total RNA and over 37 PCR cycles to obtain these products.

DISCUSSION

Previously, our group isolated, purified, and described the N-terminal sequence and the molecular mass of a protein structurally characterized as the first buck spermadhesin, named BSFP (Teixeira et al., 2002). However, we had not yet described the gene that encodes

A

Bdh-4	MKLSSVIPKALLLSTATLVST	21
AWN	MKLGSAILWALLLSTATLVSS	21
AQN-1	MKLGSATPKALLLSTATLVST	21
AQN-3	MKLGSATPKALLLSTATLVST	21
aSFP	MKLSSVIPKALLLSTATVDSM	21

B

	1	10	20	30	40	50	60	70
		S-S				S-S		
Bdh-1	-----C	GGVLRDFSGR	ISSSFSWGPX	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
Bdh-2	-----C	GGVLRDFSGR	ISSSFSWGPX	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
Bdh-3	-----C	GGVLRDFSGR	ISSSFSWGPX	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
Bdh-4	ESDEDTRKC	GGVLRDFSGR	ISSSFSWGPX	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
AWN	AWNRRSRSC	GGVLRDFSGR	IFNSDGGPKD	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
HSP-7	AWNRRSRSC	GGVLRDFSGR	IFNSDGGPKD	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
AQN-1	AQNKGPHKC	GGVLRDFSGR	ISTYGGPKTD	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
aSFP	DWLFRTNDC	GGVLRDFSGR	ISTYGGPKTD	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
AQN-3	AQNKGPHKC	GGVLRDFSGR	ISTYGGPKTD	CIWTILLKSG	YTWVLTIPFL	SLNCRNEEDVE	IIDGLPDSST	FGKFCGGGPL
		* ** . : : *	* * * . . . *	* * * . . . *	* * * . . . *	* * * . . . *	* * * . . . *	* * * . . . *
CUB sign		C t h t t	h t t t t t	C a h h t	t h h h t h	h C n h t	h t t	t h p h t
CUB pred		—βa—	—βb—	—βc—	—βd—	—βe—	—βf—	—βg—
	80	90	100	110				
Bdh-1	VFKSSSNVMT	VKYRSSNQP	VSPFDIFYE	REFCA				
Bdh-2	VFKSSSNVMT	VKYRSSNQP	VSPFDIFYE	REFCA				
Bdh-3	VFKSSSNVMT	VKYRSSNQP	VSPFDIFYE	REFCA				
Bdh-4	VFKSSSNVMT	VKYRSSNQP	VSPFDIFYE	REFCA				
AWN	VFRSSSNVMT	VKYRSSNQP	VSPFDIFYE	REFCA				
HSP-7	VFRSSSNVMT	VKYRSSNQP	VSPFDIFYE	REFCA				
AQN-1	TYQSSSNALS	IKYRRTAGHS	ASSFDIYYG	DS				
aSFP	DYRSGSINT	VKYRREPHP	ASFYEVLYFQ	DPQA				
AQN-3	VYQSSSNVAT	VKYRSDSHHP	ASSFNVPYFG	IPQGA				
	::*::	::*::	::*::	::*::	::*::	::*::	::*::	::*::
CUB sign		t h h a t t t	t t a h a					
CUB pred		—βh—	—βi—					

Fig. 3. Multiple alignment of the amino acid sequences of spermadhesins. **A:** Alignment of signal peptide of buck, boar, and bull spermadhesins. **B:** Alignment of buck, boar, stallion, and bull mature spermadhesins. Those characteristics of amino acid residues that define both the signature (CUB sign—Varela et al., 1997) and the position of the secondary structure elements (CUB pred—Bork and Beckmann, 1993) of the CUB domain are shown using the following codes: a, aromatic (Phe, Tyr, Trp); h, hydrophobic (Leu, Ile, Val, Met, Ala); t, turn-like or polar (Gly, Pro, Asn, Gln, His, Ser, Thr); n,

negatively charged (Glu, Asp); p, positively charged (Arg, Lys); β, β-strands (labeled βa-βi). The two disulfide bonds (SS) between the nearest-neighbor cysteine residues (C) which are conserved in all known spermadhesin molecules and in some CUB domains are shown in grey. The different amino acid residues among Bdh are shown in boxes. Mammalian spermadhesin sequences from *Sus scrofa* (CAI05910, CAI05911, CAI05914), *Equus caballus* (P80720) and *Bos taurus* (AAA30745) were used.

that protein. After the 3'-RACE procedure with the specific primer SMD-SE, a product of approximately 700 bp was amplified from the first-strand cDNA pool of seminal vesicle.

Following 3'- and 5'-end amplifications, we cloned and sequenced four highly similar cDNAs. The entire Bdh gene structure was annotated after analyzing translated and UTRs of cloned Bdh-1, -2, -3, and -4 fragments.

We were able to verify that the deduced polypeptides (Bdh-1, -2, -3, and -4) possessed the canonical CUB domain signature (Bork and Beckmann, 1993). In addition, the Bdh primary structures were similar to that of other spermadhesins, especially boar AWN. Interestingly, the signal peptide of Bdh-4 comprises a high sequence identity to other spermadhesins. Similar results were described in boar by Ekhlesi-Hundrieser

TABLE 3. Threshold Cycle (Ct) and Melting Temperature (T_m) Values (±SEM) Calculated From Real-Time PCR Amplifications With Seminal Vesicle cDNA (Total RNA = 4.8 ng/μl)

	Bdh-1	Bdh-2	Bdh-3
Ct ^a	27.11 ± 0.07	24.52 ± 0.36	25.17 ± 0.52
T _m (°C) ^b	78.06 ± 0.02	78.14 ± 0.02	77.96 ± 0.05

^aMean of 2 or 3 experiments.

^bMean of 6–9 experiments.

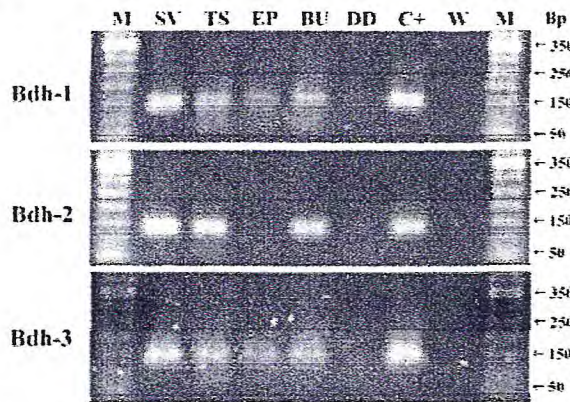


Fig. 4. Tissue-specific expression of Bdh in the buck reproductive tract. Total RNA was extracted from seminal vesicle (SV), testis (TS), epididymis (EP), bulbourethral gland (BU), and ductus deferens (DD). Following RT-PCR and real-time amplifications with specific primers for Bdh-1, Bdh-2, and Bdh-3, amplification products were separated according to size in 1.8% agarose. In control assays, cDNA was omitted (W) or a Bdh cDNA inserted into a plasmid was used as template (C+). A molecular length standard (M) of 50 bp was used.

et al. (2002) who reported a consensus sequence limited to spermadhesins. These findings taken together lead us to infer that all the Bdh are new members of the spermadhesin family. However, it is not known at this time if there are any other members in the buck reproductive tract.

Among the proteins deduced in this work, Bdh-2 was the most similar (87%) to the BSFP N-terminal (ECDETRKCGGVHRDFSGRISCCF) described by Teixeira et al. (2002). Among the 16 amino acid residues comprising Bdh-2 and BSFP, 14 of them are the same. The discrepant residues are Cys, Cys in BSFP, and Ser, Ser in all the Bdh cDNA-deduced proteins. The two BSFP amino acid residues are most probably wrong.

Bergeron et al. (2005) presented the isolation and characterization of the major proteins of RSP. The authors reported a RSP-15.5 kDa protein, which was identified as a spermadhesin by N-terminal sequencing. Interestingly, this sequence is identical to that of Bdh-4, except for Cys → Lys and Asp → Asn changes.

A virtual bull spermadhesin (XP_001251306) similar to Bdh was predicted by automated computational analysis and was derived from an annotated genomic sequence (NW_001494379) using a gene prediction method, supported by EST evidence. This bull protein has 82–85% identity with Bdh sequences, as determined with ClustalW (Higgins et al., 1994).

Few differences were observed among the Bdh cDNAs, and these differences could be implicated in some divergence in amino acid sequence in all four deduced proteins. The discrepancies in the Bdh-2 and -4 cDNAs involve a codon that encodes the polar amino acid histidine which substitutes for the hydrophobic amino acid leucine in the other Bdh, at position 13. The same polar residue was also seen in the N-terminal sequence of BSFP (Teixeira et al., 2002). The sequence consensus of the CUB domain shows a hydrophobic amino acid residue at that same site (Varela et al., 1997). According to Romão et al. (1997), there are hydrophobic core residues that stabilize the β -barrel organization and define the CUB domain signature. We cannot be certain if these findings indicate a significant difference in the structure of Bdh-2 and -4 when compared to other spermadhesins. However, despite the conserved CUB domain, spermadhesins can show structural features that are unique to each protein as observed with aSFP in relation to PSP-I and PSP-II (Romão et al., 1997). These particular differences may have implications in the structure-activity relationship and in gamete recognition during reproductive functions (Calvete et al., 1995; Reinert et al., 1996). Additionally, the replacement of Gln112, found in Bdh-1 and -3, with Ser112 or Thr112, in Bdh-2 and -4, would not affect the CUB domain architecture probably because these amino acid residues are located outside the last β -sheet in the C-terminal. Finally, based on the structures of proteins with the CUB domain consensus (Bork, 1991), both substitutions of a positively charged amino acid residue at position 72 in Bdh-3 and of a hydrophobic residue at position 73 in Bdh-1, were synonymous. Consequently, we presume that these variations would not interfere in protein folding.

Taking all these results together, Bdh seem to belong to a multigene family encoding proteins with the conserved signature of the CUB domain. Members of the spermadhesin family share similar scaffold structure (Romero et al., 1996, 1997; Romão et al., 1997), but have been associated with different functions (Töpfer-Petersen et al., 1998). The deduced Bdh showed a higher identity to boar AWN and horse HSP-7. In both species, these spermadhesins have shown ligand-binding abilities with respect to heparin, zona pellucida, and spermatozoa (Sanz et al., 1992; Calvete et al., 1993; Dostálová et al., 1995; Reinert et al., 1997). Hence, they seem to play a role in sperm-egg interaction at fertilization (Töpfer-Petersen et al., 1998). Our group

TABLE 4. Threshold Cycle (Ct) and Melting Temperature (T_m) Mean Values (\pm SEM) Calculated From Real-Time PCR Amplifications With Seminal Vesicle (SV), Testis (TS), Epididymis (EP) and Bulbourethral Gland (BU) cDNA

	SV	TS	EP	BU
Ct	25.73 \pm 0.45 ^a	>37 ^b	>38 ^b	>41 ^b
T _m (°C)	78.04 \pm 0.03 ^c	78.31 \pm 0.07 ^a	78.50 \pm 0.10 ^b	78.53 \pm 0.10 ^b
Total RNA (ng/ μ l)	4.8	48	48	48

^aMean of 8 or 9 experiments.

^bMean of 2 or 3 experiments.

^cMean of 24 experiments.

also demonstrated that buck spermadhesin does not bind to heparin (Teixeira et al., 2006); however, the meaning of its inability to interact with this modified carbohydrate and its role in the goat fertilization remains to be elucidated.

The expression of the spermadhesins along the male genital tract has not been previously studied systematically. Here, the expression patterns of Bdh are described by real-time PCR and agarose gel electrophoresis analysis. The small differences among the melting temperature values and the single electrophoretic bands indicated specific amplifications of Bdh in seminal vesicle. According to the amount of template used in PCR reaction and the Ct values, Bdh expression is significantly and measurably higher in the seminal vesicle when compared to the other tissues. Several works have demonstrated that the seminal vesicle is the main source of spermadhesins, although other reproductive tissues also produce them (Kwok et al., 1993; Dostálová et al., 1994; Sinowatz et al., 1995).

Despite the low expression levels in reproductive tissues, other than the seminal vesicle, the use of a more sensitive method, such as real-time PCR, permitted the detection of Bdh in testis, epididymis, and bulbourethral gland. This finding was supported by T_m values and electrophoretic patterns obtained in these tissues. In support of our findings, RT-PCR and immunological approaches have identified several boar spermadhesins in prostate, seminal vesicle, epididymis, and testis (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2002). Similar to the present work, boar AWN and stallion HSP-7, have also been identified in the seminal vesicle and epididymis (Reinert et al., 1997; Hoshiha and Sinowatz, 1998; Ekhlasi-Hundrieser et al., 2002). In contrast to AWN, Bdh, and HSP-7 could be found in testis. Interestingly, our data clearly show the expression of spermadhesins in bulbourethral gland, which has not been previously demonstrated in any other animals. This indicates that homologous proteins may show variation in expression pattern in different mammalian species.

Moreover, the present work confirms that goat is the fifth mammalian species, after pig, cattle, horse, and sheep, in which spermadhesin molecules are found. To our knowledge, this is the first report of buck spermadhesins genes using molecular cloning and expression profile. Among the male sexual glands, the seminal vesicle was found to be the major site of Bdh production. Further experiments are necessary to characterize the particular function of each one of these proteins in order to improve our knowledge of goat reproductive mechanisms.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful for the financial support received from CAPES, CNPq, and FUNCAP (Brazil). B.S. Cavada, V.J.F. Freitas and G. Rádís-Baptista are senior investigators of CNPq (Brazil). Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl Acid Res* 25:3389–3402.
- Ashdown RR, Done S. 2003. Color atlas of veterinary anatomy: The ruminants. Barcelona: C.V. Mosby. pp 1–35.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 71:461–470.
- Bork P. 1991. Complement components C1r/C1s, bone morphogenetic protein 1 and *Xenopus laevis* developmentally regulated protein UVS. 22 share common repeats. *FEBS Lett* 282:9–12.
- Bork P, Beckmann G. 1993. The CUB domain. A widespread module and developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 231:539–545.
- Calvete JJ, Sanz L, Dostálová Z, Töpfer-Petersen E. 1993. Characterization of AWN-1 glycosylated isoforms helps define the zona pellucida and serine proteinase inhibitor-binding region on boar spermadhesins. *FEBS Lett* 334:37–40.
- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Raida M, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 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.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1200:48–54.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Töpfer-Petersen E. 1995. 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 Seyler* 376:237–242.
- Dussault AA, Pouliot M. 2006. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online* 8:1–10.
- Ekhlasi-Hundrieser M, Sinowatz F, Greiser De Wilke I, Waberski D, Töpfer-Petersen E. 2002. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol Reprod Dev* 61:32–41.
- Haase B, Schlötterer C, Hundrieser ME, Kuiper H, Distl O, Töpfer-Petersen E, Leeb T. 2005. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* 352:20–29.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc Acids Res* 22:4673–4680.
- Hoshiha H, Sinowatz F. 1998. Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. *Anat Histol Embryol* 27:351–353.
- Kwok SC, Yang D, Dai G, Soares MJ, Chen S, McMurtry JP. 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.
- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E. 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.
- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1997. 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* 29:179–186.
- Romão MJ, Kolln I, Dias JM, Carvalho AL, Romero A, Varela PF, Sanz L, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ. 1997. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: A bovine polypeptide of the spermadhesin family. *J Mol Biol* 274:650–660.
- Romero A, Varela PF, Sanz L, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ. 1996. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of boar seminal plasma spermadhesin PSPI/PSPII, a heterodimer of two CUB domains. *FEBS Lett* 382:15–17.

- Romero A, Romão MJ, Varela PF, Kolln I, Dias JM, Carvalho AL, Sanz L, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ. 1997. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat Struct Biol* 4:783–788.
- Sanz L, Calvete JJ, Schafer W, Schmid ER, Amselgruber W, Sinowatz F, Ehrhard M, Töpfer-Petersen E. 1992. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Lett* 300:213–218.
- Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ, Sanz L, Plendl J. 1995. Immunohistochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract. *Cell Tissue Res* 282:175–179.
- Tedeschi G, Oungre E, Mortarino M, Negri A, Maffeo G, Ronchi S. 2000. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur J Biochem* 267:6175–6179.
- 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. 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, Bloch C, Jr, Rádiz-Baptista G, Cavada BS, Freitas VJF. 2006. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gen Mol Res* 5:79–87.
- Thibault C, Fournier-Delpech S. 1993. Acquisition of sperm fertilizing ability. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF, editors. *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses. pp 257–278.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses, and perspectives. *Andrologia* 30:217–224.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci* 89:159–170.
- Van Zutphen LFM, Balls M. 1997. *Animal alternatives, welfare, and ethics*. Amsterdam: Elsevier Science. pp 1–1260.
- Varela PF, Romero A, Sanz L, Romão MJ, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ. 1997. 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* 274:635–649.
- Wempe F, Einspanier R, 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.

ANEXO 2:

Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Animal Reproduction Science, In Press, 2008.

(DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.01.013)



Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Luciana M. Melo^a, Antônia S.F. Nascimento^a, Felipe G. Silveira^a,
Rodrigo M.S. Cunha^b, Nathália A.C. Tavares^c, Dárcio I.A. Teixeira^d,
José L. Lima-Filho^c, Vicente J.F. Freitas^d,
Benildo S. Cavada^{a,*}, Gandhi Rádis-Baptista^{c,**}

^a Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas - BioMol-Lab, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará. Avenida Humberto Monte s/n, bloco 907, sala 1075,

P.O. Box 6043, Campus do Pici, Fortaleza-CE 60455-970, Brazil

^b Núcleo de Biotecnologia de Sobral - NUBIS, State University of Vale do Acaraú. Rua Gerardo Rangel s/n, Campus do Derby, Sobral-CE 62041-040, Brazil

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA and Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco. Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-901, Brazil

^d Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução - LFCR, State University of Ceará, Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE 60740-000, Brazil

Received 14 July 2007; accepted 16 January 2008

Abstract

Knowledge of the different patterns of gene expression along the male reproductive tract can assist in understanding the physiological processes of species-specific reproduction in mammals. In the present work, expression profiles of buck spermadhesin (bodhesin) genes along the reproductive tract by qRT-PCR were investigated. Total RNA from the seminal vesicle, testis, epididymis, bulbourethral gland and ductus deferens were reverse transcribed and the cDNA produced was submitted to qRT-PCR. For each homologous bodhesin gene, namely Bdh-1, Bdh-2 and Bdh-3, sets of specific primers and recombinant plasmids were prepared for gene quantification. In buck seminal vesicles, Bdh-2 is the homologue predominantly expressed, with a copy number on the order of millions of times more than Bdh-1 and thousand times more than Bdh-3. The copy number of Bdh-3 mRNA is only 10-fold greater than that of Bdh-1. Bodhesin transcripts were detected in all tissues examined, except in ductus deferens. The quantitative analysis also demonstrated clearly the

* Corresponding author. Tel.: +55 85 33669818; fax: +55 85 33669818.

** Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 85 87; fax: +55 81 2126 85 87.

E-mail addresses: bscavada@ufc.br (B.S. Cavada), radisbra@ufpe.br (G. Rádis-Baptista).

differential gene expression of spermadhesin in bulbourethral gland. The striking differences in bodhesin gene expression indicate that each isoform could have a specific biological function in the buck genital tract, which deserves further detailed studies.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Capra hircus*; Buck; Spermadhesin; Gene expression; Real-time PCR

1. Introduction

The male genital tract expresses distinct classes of genes, and many of the resulting proteins are involved in the remodeling of the sperm surface, which occurs during sperm transit through the male genital tract and continues after ejaculation. This process of post-testicular maturation results in spermatozoa that have the ability to fertilize an egg (Töpfer-Petersen et al., 2005a). In ungulates, proteins called spermadhesins, belonging to a new family of animal lectins, are one of the main protein components of seminal plasma (Töpfer-Petersen et al., 2005b). These proteins encompass multifunctional polypeptides of low molecular weight (12–16 kDa) that exhibit the ability to recognize ligands as diverse as carbohydrates (Solís et al., 1998), proteinase inhibitors (Sanz et al., 1992a), phospholipids (Dostálová et al., 1995), and zona pellucida glycoproteins (Sanz et al., 1992b; Töpfer-Petersen, 1999). By binding to specific ligands, 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., 1998). Spermadhesins have been characterized from boar (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I and PSP-II), stallion (HSP-7), bull (aSFP and Z13), and ram (RSP-15 kDa) seminal plasma (Calvete et al., 1995; Varela et al., 1997; Reinert et al., 1997; Wempe et al., 1992; Tedeschi et al., 2000; Bergeron et al., 2005).

For the first time, a polypeptide of 12,591 Da was isolated, named BSFP (*buck seminal fluid protein*), from the seminal plasma of the buck, *Capra hircus* (Teixeira et al., 2002). BSFP shares 50% similarity with the swine AQN-1 and AWN spermadhesins, but is not able to bind to heparin (Teixeira et al., 2006), a biological property displayed by some members of the spermadhesin family. Further, several cDNA encoding the main isoforms of buck spermadhesins (Bdh-1–3) were cloned, collectively named bodhesins (Melo et al., 2007). The bodhesin cDNA were entirely cloned by rapid amplification of 5'- and 3'-cDNA ends. Preliminary results indicated that the seminal vesicle is the major reproductive tissue expressing bodhesin genes.

In the present work, expression profiles of bodhesin genes in several tissues of the *C. hircus* male reproductive tract (seminal vesicle, testis, epididymis, bulbourethral gland, ductus deferens and prostate) were investigated by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The copy number of the transcripts of the bodhesin homologues Bdh-1, Bdh-2 and Bdh-3 was quantified absolutely in these reproductive tissues, and possible interpretations of the present investigative work concerning goat reproduction are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Bioethics and animal welfare

The management of experimental animals was in concordance with institutional and internationally accepted welfare guidelines (American Veterinary Medical Association-AVMA, 2001).

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Anim. Reprod. Sci. (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

2.2. Animal tissues and total RNA isolation

Distinct male reproductive tissues such as the seminal vesicles (SV), testis (TS), epididymis (EP), ductus deferens (DD), bulbourethral gland (BU) and prostate (PT) were excised from a single sexually mature buck (*C. hircus*) of an undefined breed. The tissues were accessed by a surgical procedure following their anatomic location (Ashdown and Done, 2003) and were kept in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, the frozen tissues were ground into a powder and added to the Trizol reagent. After sample homogenization, the organic and aqueous phases were separated, and total RNA was precipitated with isopropyl alcohol. The RNA pellets were washed with 70% ethanol, air-dried and dissolved in RNase-free water. The yield and quality of total RNA were determined spectrophotometrically using the 260 nm absorbance and 260 nm/280 nm absorbance ratio, respectively.

2.3. Reverse transcription

Total RNA (1.2 µg) from tissues (seminal vesicles, testis, epididymis, ductus deferens, bulbourethral gland), 500 ng/µl oligo-dT primer (Promega, Madison, WI, USA) and sterile MilliQ water (to a total volume of 14 µl) were heated to 70 °C for 10 min, to disrupt possible secondary structures and then snap cooled on ice. Thereafter, a total of 100 U of superscript III H⁻ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in reverse transcription buffer, were combined with 1 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 40 U/µl of RNase inhibitor (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and RNase-free water to make a final reaction volume of 25 µl. Reverse transcription was performed at 37 °C for 60 min, and the reaction mixture finally heated to 70 °C for 15 min. The first strand cDNA products were then stored at -20 °C for later use as template for qRT-PCR (Gold et al., 2003).

2.4. cDNA standards

External controls were based on recombinant plasmids containing each bodhesin cDNA, termed pBDH-1, pBDH-2 and pBDH-3, which correspond to the genes Bdh-1, Bdh-2 and Bdh-3, respectively. These constructs were prepared from messenger RNAs (mRNA) purified from a single seminal vesicle of a sexually mature buck, and the complementary double strand cDNA fragments (ds cDNA) subcloned into pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA) as described by Melo et al. (2007). The exact sequence of the cloned amplicons was analyzed by cycle sequencing using the insert-flanking sense primer M13F or T7 and antisense primer M13R or SP6 purchased from Integrated DNA Technologies, IDT (Coralville, IA, USA). Nucleotide sequencing was performed using Dye terminator chemistry (DYEnamic ET Dye Terminator kit) on MegaBACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Each clone was sequenced twice with both sense and antisense insert-flanking primers and a consensus sequence was obtained after FredFrap analysis. The processed nucleotide sequences were submitted to GenBank, maintained by the National Center for Biotechnology Information—NCBI, and received the following accession numbers: DQ204877 (Bdh-1), EF157969 (Bdh-2), and EF157970 (Bdh-3).

The plasmid concentrations were spectrophotometrically measured, using the GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (GE Healthcare, Piscataway-NJ, USA), and the corresponding copy

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), *Anim. Reprod. Sci.* (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

Table 1

Specific primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of homologous bodhesin genes (Bdh-1, Bdh-2 and Bdh-3)

Name	Nucleotide sequence
BDH-SE	F: 5'-TGGACCATCCTCTTGAAGA-3'
BDH-AS1	R: 5'-CTGAACAGAGCCTCCCAA-3'
BDH-AS2	R: 5'-CTGAACAGAACCTCCCAA-3'
BDH-AS3	R: 5'-CTGAACAGAACTTCCCAA-3'

number was calculated using the following equation:

$$1 \mu\text{g of 3000 bp DNA} = 3.02 \times 10^{11} \text{ molecules}$$

Serial dilutions from the resulting clones were used to produce standard curves, each containing a known amount of input copy number.

2.5. PCR amplifications

The cDNA samples corresponding to each reproductive tissue were diluted, yielding synthesized cDNA on the order of 72–0.28 ng of total RNA per μl . Specific primers, summarized in Table 1, were synthesized based on buck spermadhesin cDNAs sequences (accession numbers DQ204877, EF157969 and EF157970), one sense (BDH-SE) and three antisense primers (BDH-AS1, BDH-AS2 and BDH-AS3) were used in specific combinations in all experiments. Amplification of buck spermadhesin cDNA was conducted in the Rotor-Gene 3000 operated with the respective Rotor Gene software, version 6.0.19 (Corbett Research, Mordake, Australia). Each reaction consisted of: 3 μl of cDNA solution (72–0.28 ng reverse transcribed total RNA or 138 ng to 138 fg of plasmid cDNA), 500 nM of primers and 10 μl of SYBR Green PCR Core Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final reaction volume of 20 μl . Amplification conditions were as follows: 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), and 72 °C (20 s) in 45 repetitions. Fluorescence was determined at 494–521 nm during the extension phase. Specificity of each reaction was ascertained after completion of the amplification protocol. This was achieved by performing the melting procedure (55–90 °C; 1 °C/5 s). Additionally, we tested each cDNA plasmid with both the common sense primer BDH-SE and all three antisense BDH primers. Finally, the PCR products were separated on a 1.5% agarose gel, stained with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of ethidium bromide, and visualized with a UV transilluminator (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

2.6. Data analysis

Threshold and Ct (threshold cycle) values were automatically determined by Rotor Gene 6.0.19 software, using default parameters. The Ct and Tm data were expressed as means of two or more measurements \pm S.E.M. and were compared using Student's *t* test ($P < 0.05$). The absolute quantification of Bdh-1, -2 and -3 in seminal vesicle, testis, ductus deferens, bulbourethral gland and epididymis was conducted as described by Overbergh et al. (1999). The values were normalized to initial amounts of total RNA, as suggested by Bustin (2000). The copy number of molecules was presented as means of two to six measurements \pm S.E.M. The corresponding real-time PCR efficiencies (*E*) of cycles in exponential phase were calculated from the given

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Anim. Reprod. Sci. (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

slopes (S) in Rotor Gene 6.0.19 software, according to the equation:

$$E = 10^{(-1/S)} - 1$$

Linearity was expressed as the square of the Pearson correlation coefficient (R^2).

3. Results

The yield of total RNA from diverse tissues of the buck genital tract, expressed as μg of total RNA per mg of tissue, was 0.77 for seminal vesicle, 0.72 for testis, 2.07 for bulbourethral gland, 0.62 for epididymis, 0.27 for ductus deferens, and 0.10 for prostate. The RNA preparation was considered of excellent quality, since the ratio 260 nm/280 nm was about 1.82, and because the integrity of 28S and 18S rRNA was confirmed (proportionally 3:1, respectively) by agarose gel electrophoresis. Due to the small yield of total RNA from prostate, this sample was excluded from the quantitative analysis.

The Ct values were calculated for those reactions, in which serial dilutions of pBDH-1, pBDH-2 and pBDH-3 were used as template, and in which combinatorial mixtures of specific pairs of bodhesin sense and anti-sense primers (BDH-SE/BDH-AS1, BDH-SE/BDH-AS2 and BDH-SE/BDH-AS3) were achieved, as summarized in Table 2.

There were no statistical differences between Tm mean values (\pm S.E.M.) for the bodhesin amplicons calculated from cDNAs templates of seminal vesicle (78.18 ± 0.05 , $n=36$), testis (77.80 ± 0.03 , $n=9$), bulbourethral gland (78.37 ± 0.06 , $n=9$) and epididymis (78.44 ± 0.04 , $n=9$), as well from the purified plasmids pBDH-1 (78.31 ± 0.08 , $n=15$), pBDH-2 (78.37 ± 0.02 , $n=12$) and pBDH-3 (78.34 ± 0.06 , $n=18$).

The PCR efficiencies (E) for standard curves, when the plasmids pBDH-1, pBDH-2 and pBDH3 were used as independent templates, are shown in Fig. 1, where the curve equations and the R^2 values are also presented.

Amplifications of bodhesin complementary first strand DNA were detected in all reproductive tissues examined except ductus deferens (Fig. 2). The absolute quantifications of bodhesin transcripts in the seminal vesicle, as well in all the other male reproductive tissues (testis, bulbourethral gland and epididymis) are indicated in Fig. 3. Electrophoretic analysis of bodhesin amplicons, obtained from some representative qRT-PCR experiments, is presented in Fig. 4.

Table 2

Ct mean values for bodhesin homologues calculated from real-time PCR experiments using the recombinant plasmids pBDH-1, pBDH-2 and pBDH3 as templates, the sense primer BDH-SE, and the three different specific anti-sense primers BHD-AS1, BHD-AS2 or BHD-AS3

Plasmid	Antisense primer	Ct \pm S.E.M.
pBDH-1 (5.7 ng/ μl) ^a	BDH-AS1	5.46 \pm 0.46
	BDH-AS2	7.38 \pm 0.38
	BDH-AS3	20.06 \pm 0.21
pBDH-2 (3.75 ng/ μl) ^a	BDH-AS1	11.45 \pm 0.32
	BDH-AS2	6.27 \pm 0.53
pBDH-3 (6.9 ng/ μl) ^a	BDH-AS3	15.64 \pm 0.14
	BDH-AS1	19.85 \pm 0.06
	BDH-AS2	10.3 \pm 0.96
	BDH-AS3	7.54 \pm 0.30

^a DNA concentration used for each reaction group. For all comparisons within groups, there was a difference ($P < 0.05$).

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Anim. Reprod. Sci. (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

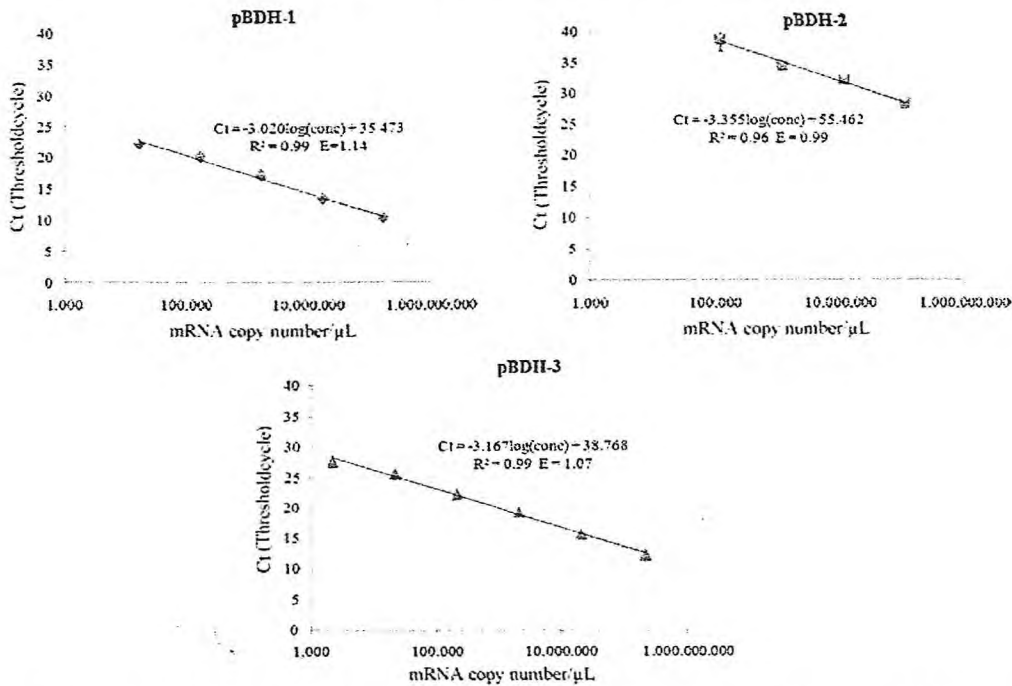


Fig. 1. Standard curves of real-time PCR amplifications of bodhesin genes. Serial dilutions of bodhesin cDNA plasmids (pBDH-1, pBDH-2 and pBDH-3) were performed for quantification experiments. The curve equations, efficiency values (E) and square of Pearson correlation coefficient (R²) were plotted.

4. Discussion

Quantitative PCR has become a standard method for measuring gene expression by evaluating amount of mRNA (Ong and Irvine, 2002). In the present work, the gene expression profile of bodhesin genes in tissues of the buck reproductive tract was investigated. To achieve this purpose, total mRNA from different tissues of the buck reproductive tract were reversed transcribed, and the synthesized cDNA were submitted to qRT-PCR. The prepared total RNA were of good quality, as assessed by the integrity of the 28S and 18S rRNA subunits, absence of genomic DNA (data not shown), and the 260 nm/280 nm ratio. The small yield of total RNA from prostate is due to the small amount of starting material, because this gland is extremely small in the buck (Konig and Liebich, 2004).

As the first step in analysis in the present research, the specificity of a combinatorial mixture of primer pairs that were designed in accordance with the distinct sequences of each bodhesin homologue was determined. Amplification of each homologue with its respective pair of primers was favored, whenever stringent real-time PCR conditions were used. This was numerically probed by the lesser threshold cycle (Ct) values ($P < 0.05$), obtained in reactions in which the primers BDH-SE/BDH-AS1 and the template pBDH-1 were combined. In contrast, the calculated Ct values were greater when pBDH-1 was used as template, and BDH-SE/BDH-AS2 or BDH-SE/BDH-AS3 as other primer pair in separate reactions. Similar results were found for pBDH-2 and pBDH-3. Moreover, specificity of bodhesin gene amplifications by the melting temperature (T_m) values of all amplicons was probed, by the melting curves (data not shown) and by the

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Anim. Reprod. Sci. (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

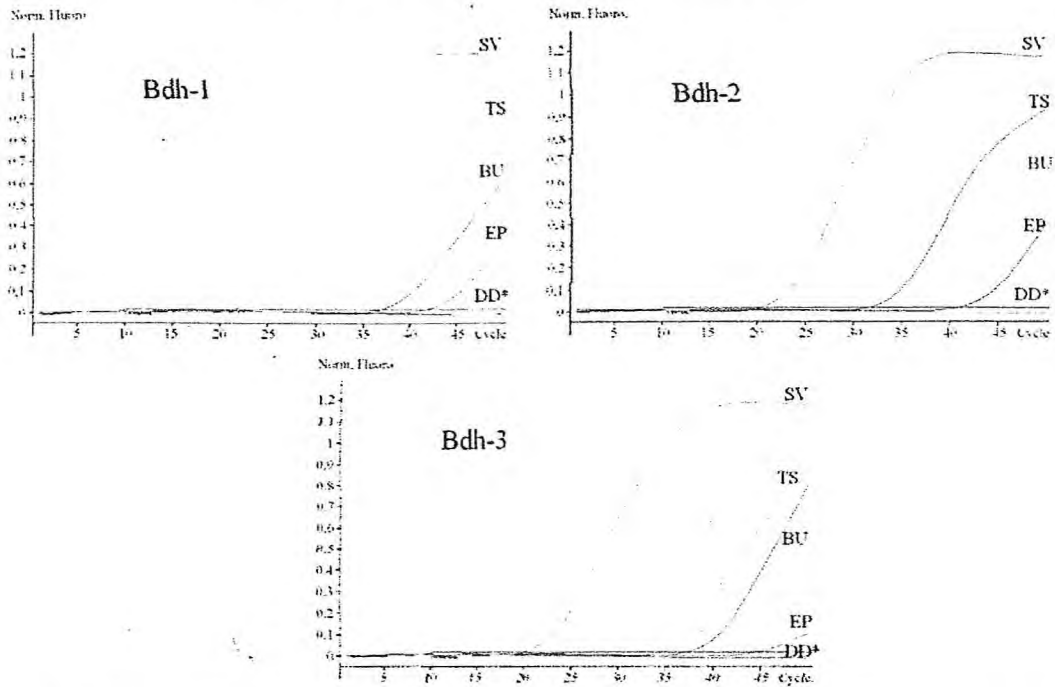


Fig. 2. Curves of fluorescence versus cycle number for real-time PCR amplifications of bodhesin genes (Bdh-1, Bdh-2 or Bdh-3). Complementary DNAs from seminal vesicle (VS), testis (TS), ductus deferens (DD), bulbourethral gland (BU) or epididymus (EP) were used as templates. The fluorescence signal was plotted as arbitrary units. *Fluorescence signal significantly less than threshold.

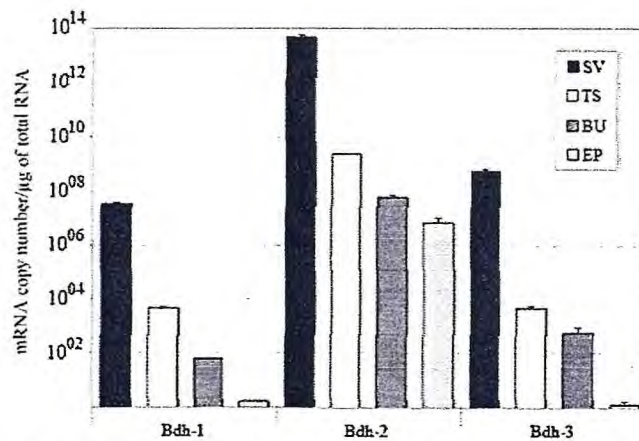


Fig. 3. Absolute quantification of bodhesin transcripts (Bdh-1, Bdh-2 and Bdh-3). Transcription of bodhesin genes, in seminal vesicle (SV), testis (TS), bulbourethral gland (BU) and epididymus (EP) was assessed by qRT-PCR, as described in Section 2. Values were normalized in reaction to the total amount of inputted RNA.

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Anim. Reprod. Sci. (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013



Fig. 4. Electrophoretic analysis of qRT-PCR amplicons. Bodhesin (Bdh-1, Bdh-2 and Bdh-3) amplifications were performed using seminal vesicle (SV), testis (TS), ductus deferens (DD), bulbourethral gland (BU) or epididymus (EP) cDNA, according to the descriptions in Section 2. As negative control, cDNA was omitted (W) or a bodhesin cDNA plasmid was used as template (positive control, C+). A molecular weight ladder (M) of 50 bp is shown.

electrophoretic analysis of agarose gels of bodhesin amplicons generated in all tissues, which allowed the verification of a single product of ~130 bp.

For the absolute quantification of bodhesin transcripts, standard curves were constructed. In all standard curves of Ct versus DNA concentration, the R^2 values were more than 0.96, which indicated an excellent linearity between these parameters (Pfaffl, 2001). In addition, the efficiency values (E) in the present experiments were close to 1.0, indicating the excellent quality of the real-time PCR amplifications (Sthalberg et al., 2003).

Subsequently, the absolute quantification of bodhesin transcripts in the buck tissues was performed. The quantification of bodhesins in seminal vesicle showed that Bdh-2 is the homologue predominantly expressed, with a number of copies in the order of millions of times more than Bdh-1 and thousand times more than Bdh-3. The number of copies of Bdh-3 mRNA is, however, only 10-fold greater than that of Bdh-1. These striking differences in bodhesin gene expression could reflect the specific biological function that each isoform possesses in the buck genital tract, particularly in the seminal vesicle. In pigs, isoforms of spermadhesin that are subject to post-translation modification have been reported (Sanz et al., 1992a; Calvete et al., 1995). Such protein isoforms have distinct biochemical and, consequently, biological functions (Calvete et al., 1993).

The knowledge of the different patterns of gene expression along the male reproductive tract and the analysis of the relative abundance of several protein classes can assist in understanding the physiological processes of species-specific reproduction in mammals (Ekhlas-Hundrieser et al., 2007). Bodhesin gene expression was verified in all tissues examined except ductus deferens, as observed in amplification curves of cDNA and confirmed by electrophoretic analysis of amplicons. The seminal vesicle absolutely transcribes many more bodhesin genes than any other buck reproductive tissue, as easily observed by density analysis of the electrophoretic bands of agarose gel. Moreover, in the present study the seminal vesicle had 180,000 times more Bdh-1 than does the epididymis, 18,000 times more than does the bulbourethral gland, and only 800 times more than the testis. The relative contents of Bdh-2 and Bdh-3 transcripts were similar. The present detailed quantification of spermadhesin genes is in accord with our previous report where

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Anim. Reprod. Sci. (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

cDNA pools from the reproductive tract of different specimens of buck were analyzed (Melo et al., 2007). In addition, the present research and that of others with pigs (Sinowatz et al., 1995), horses (Hoshiba and Sinowatz, 1998), and boars (Garcia et al., 2007), are in accord with respect to the pattern and the amount of spermadhesin gene expression along the reproductive tissues. For instance, the production of spermadhesin in tissues other than seminal vesicle has been reported (Kwok et al., 1993; Dostálová et al., 1994; Hoshiba and Sinowatz, 1998). In fact, Western blotting, immunohistochemistry and RT-PCR analysis of the pig seminal vesicle, prostate, epididymis and testis, lend support to present qRT-PCR results (Ekhlas-Hundrieser et al., 2002). The pig AWN and horse HSP-7 were similarly detected in the seminal vesicle and epididymis (Reinert et al., 1997; Hoshiba and Sinowatz, 1998; Ekhlas-Hundrieser et al., 2002). However, only horse HSP-7 and the buck bodhesins have been found in testis. Differential and quantitative gene expression for bodhesins in the bulbourethral gland also occurred in the present study. Moreover, the genes for spermadhesin PSP-I and PSP-II from boar seminal plasma were shown, by real-time PCR and immunohistochemistry, to be expressed by epididymal segments, testis and the bulbourethral gland, although the seminal vesicles were also the main source of these spermadhesins (Garcia et al., 2007).

Thus far, several molecular biology techniques have been in use for gene expression analysis, including Northern blotting, ribonuclease protection assay and reverse transcriptase coupled to polymerase chain reaction. Quantitative real-time PCR allowed for accurate determination of the differential expression profile of bodhesin genes in the buck reproductive tract in the present research. Therefore, a more comprehensive view of the presence of spermadhesins in tissues other than the seminal vesicle could be assessed. In fact, the use of these techniques broadens the concept of spermadhesin as a class of polypeptides restricted to the male reproductive tract. Transcripts of spermadhesin genes were also found in the uterus and uterus-oviduct junction of sows (Ekhlas-Hundrieser et al., 2002).

Altogether, data from the present research corroborate the cellular origin of spermadhesins and their species-specific intrinsic properties (Hoshiba and Sinowatz, 1998; Sinowatz et al., 1995). These results suggest that there would be a contribution from each reproductive tissue to the content and structural diversification of spermadhesins in the seminal plasma, and the combination of isoforms could contribute to such species-specific role in the reproductive process of fertilization.

To the best of our knowledge, this is the first study of the quantitative gene expression of buck spermadhesins along the reproductive tract. Further experiments will be necessary to understand the biological function of all bodhesin isoforms in the process of goat reproduction.

References

- American Veterinary Medical Association (AVMA), 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 669–696.
- Ashdown, R.R., Done, S., 2003. *Color Atlas of Veterinary Anatomy: The Ruminants*. C.V. Mosby, Barcelona, Spain.
- Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P., 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 461–470.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.
- Calvete, J.J., Solis, D., Sanz, L., Diaz-Maurino, T., Schafer, W., Mann, K., Topfer-Petersen, E., 1993. Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *Eur. J. Biochem.* 1, 719–725.
- Calvete, J.J., Mann, K.M., Schafer, W., Raida, M., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., 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.

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), *Anim. Reprod. Sci.* (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

- Dostálová, Z., Calvete, J.J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochem. Biophys. Acta* 1200, 48–54.
- Dostálová, Z., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E., 1995. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AWN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 237–242.
- Ekhlas-Hundrieser, M., Sinowatz, F., Greiser, D.E., Wilke, I., Waberski, D., Töpfer-Petersen, E., 2002. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 32–41.
- Ekhlas-Hundrieser, M., Schafer, B., Philipp, U., Kuiper, H., Leeb, T., Mehta, M., Kirchhoff, C., Töpfer-Petersen, E., 2007. Sperm-binding fibronectin type II-module proteins are genetically linked and functionally related. *Gene* 392, 253–265.
- García, E.M., Vázquez, J.M., Parrilla, I., Ortega, M.D., Calvete, J.J., Sanz, L., Martínez, E.A., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., 2007. Localization and expression of spermadhesins PSP-I/PSP-II subunits in the reproductive organs of the boar. *Int. J. Androl.* (epub ahead of print).
- Gold, E.J., Francis, R.J.B.A.Z., Mellor, S.L., Cranfield, M., Risbridger, G.P., Groome, N.P., Wheatley, A.M., Fleming, J.S., 2003. Changes in activin and activin receptor subunit expression in rat liver during the development of CCL₄-induced cirrhosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 143–153.
- Hoshiba, H., Sinowatz, F., 1998. Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. *Anat. Histol. Embryol.* 27, 351–353.
- Konig, H.E., Liebich, H.G., 2004. *Anatomia dos Animais Domésticos: Órgãos e Sistemas*. Artmed, Porto Alegre, Brazil.
- Kwok, S.C., Soares, M.J., Chen, S., McMurtry, J.P., Yurewicz, E.C., 1993. Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 244–250.
- Melo, L.M., Teixeira, D.I.A., Havt, A., Cunha, R.M.S., Martins, D.B.G., Castelletti, C.H.M., Souza, P.R.E., Lima Filha, J.L., Freitas, V.J.F., Cavada, B.S., Rádís-Baptista, G., 2007. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Mol. Reprod. Dev.*, doi:10.1002/mrd.20757.
- Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C., 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11, 305–312.
- Ong, Y.L., Irvine, A., 2002. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. *Hematology* 7, 59–67.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29, 2002–2007.
- Reinert, M., Calvete, J.J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., 1997. 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* 29, 179–186.
- Sanz, L., Calvete, J.J., Jonáková, V., Töpfer-Petersen, E., 1992a. Boar spermadhesins AQN-1 and AWN are sperm-associated acrosin inhibitor acceptor proteins. *FEBS* 300, 63–66.
- Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Schafer, W., Schmid, E.R., Töpfer-Petersen, E., 1992b. The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. *Eur. J. Biochem.* 205, 645–652.
- Sinowatz, F., Amselgruber, W., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., Sanz, L., Plendl, J., 1995. Immunohistochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract. *Cell Tissue Res.* 282, 175–179.
- Solís, D., Romero, A., Jiménez, M., Díaz-Mauriño, T., Calvete, J.J., 1998. Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. *FEBS Lett.* 431, 273–278.
- Sthalberg, P., Aman, B., Ridell, P., Mostad, Kubista, M., 2003. Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of κ and λ immunoglobulin light chain expression. *Clin. Chem.* 49, 51–59.
- Tedeschi, G., Oungre, E., Mortarino, M., Negri, A., Maffeo, G., Ronchi, S., 2000. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem.* 267, 6175–6179.
- Teixeira, D.I.A., Cavada, B.S., Sampaio, A.H., Havt, A., Bloch Jr., C., Prates, M.V., Moreno, F.B., Santos, E.A., Gadelha, C.A., Gadelha, T.S., Crisóstomo, F.S., Freitas, V.J.F., 2002. Isolation and partial characterization of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. *Prot. Pep. Lett.* 9, 331–335.
- Teixeira, D.I.A., Melo, L.M., Gadelha, C.A.A., Cunha, R.M.S., Bloch Jr., C., Rádís-Baptista, G., Cavada, B.S., Freitas, V.J.F., 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., 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reprod. Update* 5, 314–329.

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), *Anim. Reprod. Sci.* (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

- Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P.F., Ekhlesi-Hundrieser, M., Dostálová, Z., Sanz, L., Calvete, J.J., 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30, 217–224.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Kirchhoff, C., Leeb, T., Sieme, H., 2005a. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 159–170.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsołova, M., Leeb, T., Kirchhoff, C., Müller, P., 2005b. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia* 37, 202–204.
- Varela, P.F., Romero, A., Sanz, L., Romão, M.J., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., 1997. 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.* 274, 635–649.
- Wempe, F., Einspanier, R., Scheit, K.H., 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.

Please cite this article in press as: Melo, L.M., et al., Quantitative expression analysis of Bodhesin genes in the buck (*Capra hircus*) reproductive tract by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), *Anim. Reprod. Sci.* (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.013

ANEXO 3:

Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma.

Genetics and Molecular Research, v.5, p.79-87, 2006.

Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma

Dárcio Ítalo Alves Teixeira¹, Luciana Magalhães Melo²,
Carlos Alberto de Almeida Gadelha²,
Rodrigo Maranguape Silva da Cunha², Carlos Bloch Jr.³,
Gandhi Rádis-Baptista², Benildo Sousa Cavada² and
Vicente José de Figueirêdo Freitas¹

¹Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução,
Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²BioMol-Lab, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

³Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA-CENARGEN,
Caixa Postal 02372, Brasília, DF, Brasil

Corresponding author: V.J.F. Freitas

E-mail: vjff@uece.br

Genet. Mol. Res. 5 (1): 79-87 (2006)

Received October 20, 2005

Accepted December 7, 2005

Published March 17, 2006

ABSTRACT. Mammalian seminal plasma contains among others, proteins called spermadhesins, which are the major proteins of boar and stallion seminal plasma. These proteins appear to be involved in capacitation and sperm-egg interaction. Previously, we reported the presence of a protein related to spermadhesins in goat seminal plasma. In the present study, we have further characterized this protein, and we propose ion-exchange chromatography to isolate this seminal protein. Semen was obtained from four adult Saanen bucks. Seminal plasma was pooled, dialyzed against distilled water and freeze-dried. Lyophilized proteins were loaded onto an ion-exchange chromatography column. Dialyzed-lyophilized proteins from the main peak of DEAE-Sephacel were applied to a C2/C18 column coupled to an RP-HPLC system, and the eluted proteins were lyophilized for electrophoresis. The N-terminal was sequenced and amino acid sequence similarity was determined using

CLUSTAL W. Additionally, proteins from DEAE-Sephacel chromatography step were dialyzed and submitted to a heparin-Sepharose high-performance liquid chromatography. Goat seminal plasma after ion-exchange chromatography yielded 6.47 ± 0.63 mg (mean \pm SEM) of the major retained fraction. The protein was designated BSFP (buck seminal fluid protein). BSFP exhibited N-terminal sequence homology to boar, stallion and bull spermadhesins. BSFP showed no heparin-binding capabilities. These results together with our previous data indicate that goat seminal plasma contains a protein that is structurally related to proteins of the spermadhesin family. Finally, this protein can be efficiently isolated by ion-exchange and reverse-phase chromatography.

Key words: Goat, Seminal plasma, Lectin, Spermadhesin

INTRODUCTION

Stockert et al. (1974) published a paper describing an agglutinin for human or lapine erythrocytes found in rabbit liver. This "mammalian hepatic lectin", as they called it, was claimed to be "the first lectin of mammalian origin". Animal lectins mediate biological processes ranging from protein folding and trafficking to the modulation of cell-cell and cell-matrix interactions (Drickamer and Taylor, 1993; Gabius, 1997).

Seminal plasma, the fluid in which mammalian spermatozoa are suspended in semen, is a complex mixture of secretions originating from the epididymis and the male accessory reproductive organs. It contains a variety of both inorganic and organic components, among which proteins are a major part of the high-molecular mass substances. The protein composition of seminal plasma varies from species to species, but studies on several mammalian species indicate that seminal plasma contains factors that influence the fertilizing ability of spermatozoa and exert important effects on female reproductive physiology (Shivaji et al., 1990; Waberski et al., 1995).

A protein family called spermadhesins has been detected in seminal plasma of many domestic species. These proteins are a group of 12- to 16-kDa polypeptides found in the seminal plasma and peripherally associated with the spermatozoa surface. They are multifunctional proteins exhibiting ligand-binding affinities to an array of oligosaccharides and sulfated polysaccharides such as heparin and also to serine protease inhibitor and phospholipids (Töpfer-Petersen et al., 1998). The amino acid sequence of these proteins does not show any discernible similarity to known carbohydrate-recognition domains, indicating that spermadhesins may belong to a novel group of animal lectins.

Boar spermadhesins are a group of proteins found in seminal plasma, and they are major secretory products of the seminal vesicle epithelium. These proteins are composed of 109-133 amino acids, contain two conserved disulfide bridges, and have 40-60% amino acid sequence identity (reviewed in Töpfer-Petersen et al., 1995, 1998). Both non- and *N*-glycosylated forms of spermadhesins have been described (Calvete et al., 1993). Two spermadhesin subfamilies AQN (AQN-1, AQN-2, and AQN-3) and AWN (AWN-1, and AWN-2) - named

According to their first three N-terminal amino acids - were shown to bind to the acrosomal cap of boar epididymal spermatozoa, which classified them as sperm surface proteins (Jonakova et al., 1998). The affinity of sperm-bound spermadhesins for acid polysaccharides pointed to their interaction with heparin-like glycosaminoglycans secreted by the epithelium of the female reproductive tract (Tienthai et al., 2000). This hypothesis led to the idea that these proteins are involved in sperm capacitation. Besides that, their ability to bind to zona pellucida glycoproteins has suggested their role in sperm-egg interactions (Sanz et al., 1993; Jonakova et al., 1998; Ticha et al., 1998).

Proteins homologous to boar spermadhesins were also found in stallion (Calvete et al., 1995a) and bull (Einspanier et al., 1994; Calvete et al., 1996) seminal plasma. The study of homologous proteins in seminal plasma of different species may elucidate their functions in the fertilization process.

In our previous communication, we reported the presence of a low-molecular mass protein related to boar spermadhesins in goat seminal plasma (Teixeira et al., 2002). In the present study, we characterized this protein further, and we propose ion-exchange chromatography as a method to best isolate this seminal protein.

MATERIAL AND METHODS

Local and experimental animals

This experiment was carried out at both the Laboratory of Physiology and Control of Reproduction (State University of Ceará) and Biomol-Lab (Federal University of Ceará), located in Fortaleza, CE, Brazil (3°43'S, 38°30'W).

Four Saanen bucks (*Capra hircus*) used for semen collection were aged 2 to 4 years and individually penned (4 m²/pen) in a well-ventilated shed. The animals were fed with elephant grass (*Pennisetum purpureum*) and with a concentrate mixture (18% crude protein minimum). They had free access to water and mineral blocks.

Collection and storage of semen

Semen was collected twice a week always at 7:00 am with the use of an artificial vagina. The collection procedure was facilitated by the use of a female goat that had been estrus-induced by an intramuscular injection of estradiol. After collection, the semen was evaluated for the following parameters: volume, mass motility and progressive individual motility, centrifuged at 800 g for 10 min, and the sperm pellet was discarded. The supernatant (seminal plasma) was stored at -20°C until be used.

Isolation

Pooled seminal plasma was dialyzed against distilled water and freeze-dried. Lyophilized proteins (20 mg) were dissolved in 0.02 M phosphate buffer, pH 7.0, and loaded onto an ion-exchange chromatography column (DEAE-Sephacel, 1.2 x 20 cm), which was previously equilibrated with the same buffer. After removal of the non-retained material, the column was eluted with a NaCl gradient (0-1 M) in buffer.

Dialyzed-lyophilized proteins from the main peak of DEAE-Sephacel were applied to a C2/C18 column (100 x 4.6 mm, 3 μ m, 120 Å; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) coupled to a reverse phase-high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) system. They were eluted using 0.1% (v/v) TFA in water (solvent A) and 0.1% (v/v) TFA in acetonitrile (solvent B) buffer system: first isocratically at 0% B (7 min), followed by a gradient of 0-40% B (4 min), 40-45% B (11 min), and 100% B (10 min). Fractions were collected at a flow rate of 1 mL/min and monitored at 280 nm. Eluted proteins were lyophilized for electrophoresis.

Detection and characterization

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed on 12.5% polyacrylamide gels according to Laemmli (1970), and proteins were silver-stained. The N-terminal of putative spermadhesin was sequenced on an Applied Biosystems 477A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Proteins from the DEAE-Sephacel chromatography step were dialyzed against 0.02 M phosphate buffer, pH 7.0, concentrated to 0.5 mL and loaded onto a heparin-Sepharose high-performance column (0.7 x 2.5 cm, 34 μ m; Amersham Biosciences), which was previously equilibrated with the same buffer. Once the sample entered the column, the flow was stopped for 15 min to allow proteins to bind. After removal of the non-retained material, the column was eluted with an NaCl gradient (0-1 M) in buffer. Fractions were collected at a flow rate of 1 mL/min and monitored at 280 nm. Eluted proteins were lyophilized for SDS-PAGE, as described above.

Multiple alignment for similarity search

Amino acid sequence similarity searches were carried out using the program CLUSTAL W (Chenna et al., 2003). A cladogram tree was made using the same program and according to the PHYLIP method (Saitou and Nei, 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

Although several seminal plasma proteins of different mammalian species have homologous primary structures (Einspanier et al., 1994; Reinert et al., 1996; Jonakova et al., 1998), their role in the fertilization process may be different. Proteins related to boar spermadhesins were found in bull and stallion seminal plasma (Einspanier et al., 1994; Calvete et al., 1995a). However, little attention has been paid to goat proteins homologous to boar spermadhesins.

The semen collected during the whole experimental period showed normal values concerning the parameters examined: volume, mass motility and progressive individual motility. These values were in accordance with those expected for male goats used in artificial insemination centers (Leboeuf et al., 2000).

Goat seminal plasma after ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephacel column (Figure 1) yielded 6.47 ± 0.63 mg (mean \pm SEM, N = 10) of a major retained fraction. The recovery of eluted proteins was $32.35 \pm 3.16\%$ (w/w) of starting material.

The RP-HPLC elution pattern of ion-exchange-bound proteins is shown in Figure 2. The protein studied was obtained in a pure state and the sequence of chromatography steps

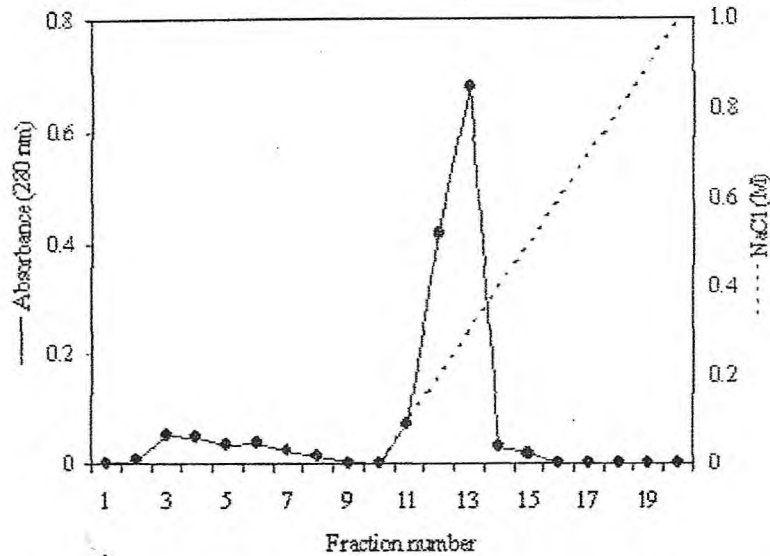


Figure 1. Ion-exchange chromatography of goat seminal plasma on a DEAE-Sepharose column. The column was washed with 0.02 M phosphate buffer, pH 7.0, at a flow rate of 30 mL/h and then eluted with a linear gradient of 0 to 1 M NaCl.

performed was efficient in purifying this protein as demonstrated by SDS-PAGE (Figure 2 - insert). This protein showed an apparent molecular mass of 12 kDa and was initially designated BSFP (buck seminal fluid protein) as previously described by Teixeira et al. (2002). The molecular mass was verified by the same authors using MALDI-TOF which exhibited a value of 12.591 kDa. The values for molecular mass are similar to that reported for AWN, a 14-kDa multifunctional protein, isolated from boar semen, which is one of the best structurally characterized spermadhesin so far (Ensslin et al., 1995; Jelinkova et al., 2003, 2004).

The N-terminal sequence of BSFP determined by automatic protein sequence analysis is presented in Figure 3A. BSFP exhibited N-terminal sequence homology to boar (AQN-1 and AWN), stallion (AWN) and bull (aSFP) spermadhesins (Figure 3B). In addition, BSFP also exhibited a high degree of similarity (50%) with the N-terminal sequence of boar AQN-1. Members of the spermadhesin family share 40 to 90% sequence identity but they are not functionally equivalent (Töpfer-Petersen et al., 1998).

Seminal plasma carbohydrate- and heparin-binding proteins of the spermadhesin family coat the surface of boar and stallion spermatozoa at ejaculation and are believed to participate in sperm capacitation and in the recognition between and initial protein-carbohydrate-binding mechanism of homologous gametes at fertilization (Töpfer-Petersen and Calvete, 1996; Reinert et al., 1996). However, each spermadhesin exhibits a different set of affinities depending on their glycosylated and aggregated state (Töpfer-Petersen, 1999). In addition, other spermadhesins do not show interaction with heparin and zona pellucida glycoconjugates, for example boar PSP-I (Varela et al., 1997), PSP-I/PSP-II complex (Solis et al., 1998) and bull aSFP (Romão et al., 1997). In our study, BSFP showed no heparin-binding capabilities as observed by heparin-

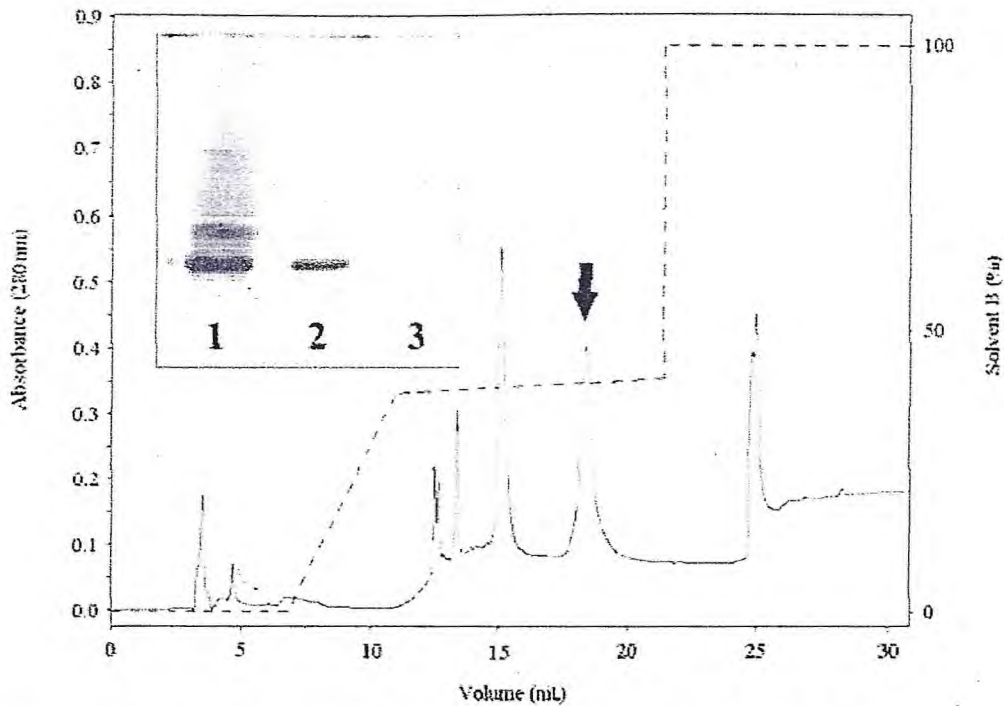


Figure 2. Reverse phase-high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) pattern of DEAE-Sephacel-retained fraction. Proteins were eluted using 0.1% (v/v) TFA in water (solvent A) and 0.1% (v/v) TFA in acetonitrile (solvent B). *Insert*, SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis: lane 1, goat seminal plasma; lane 2, goat seminal plasma after DEAE chromatography, and lane 3, buck seminal fluid protein obtained from RP-HPLC (arrow in chromatogram).

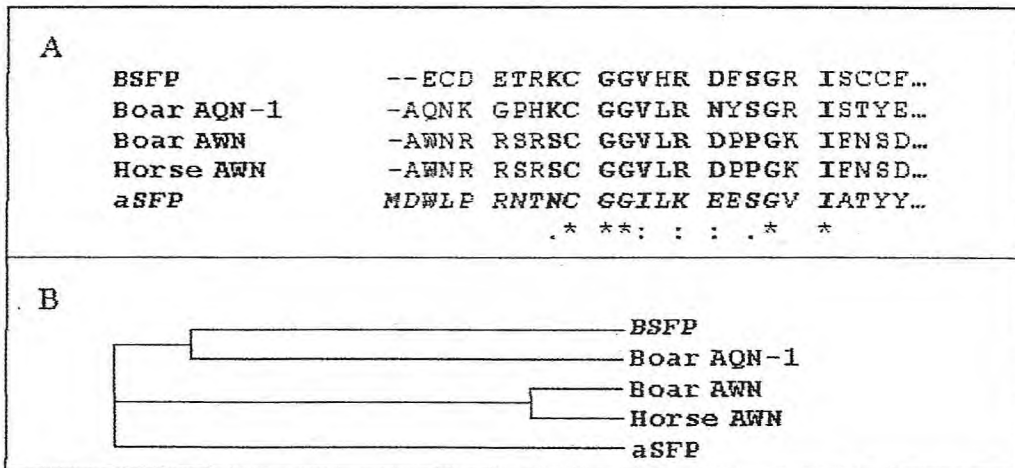


Figure 3. Comparison of N-terminal amino acid sequences of BSFP with boar (AQN-1, AWN), stallion (AWN) and bull (aSFP) spermadhesins. **A**. Alignment performed by CLUSTAL W. Asterisks mean identical residues in the column of all sequences; colons mean conserved substitutions, and periods mean semi-conserved substitution. **B**. Cladogram obtained from CLUSTAL W alignment with default settings. BSFP = buck seminal fluid protein.

Sephacel chromatography of the DEAE-Sephacel-retained fraction and SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis (Figure 4).

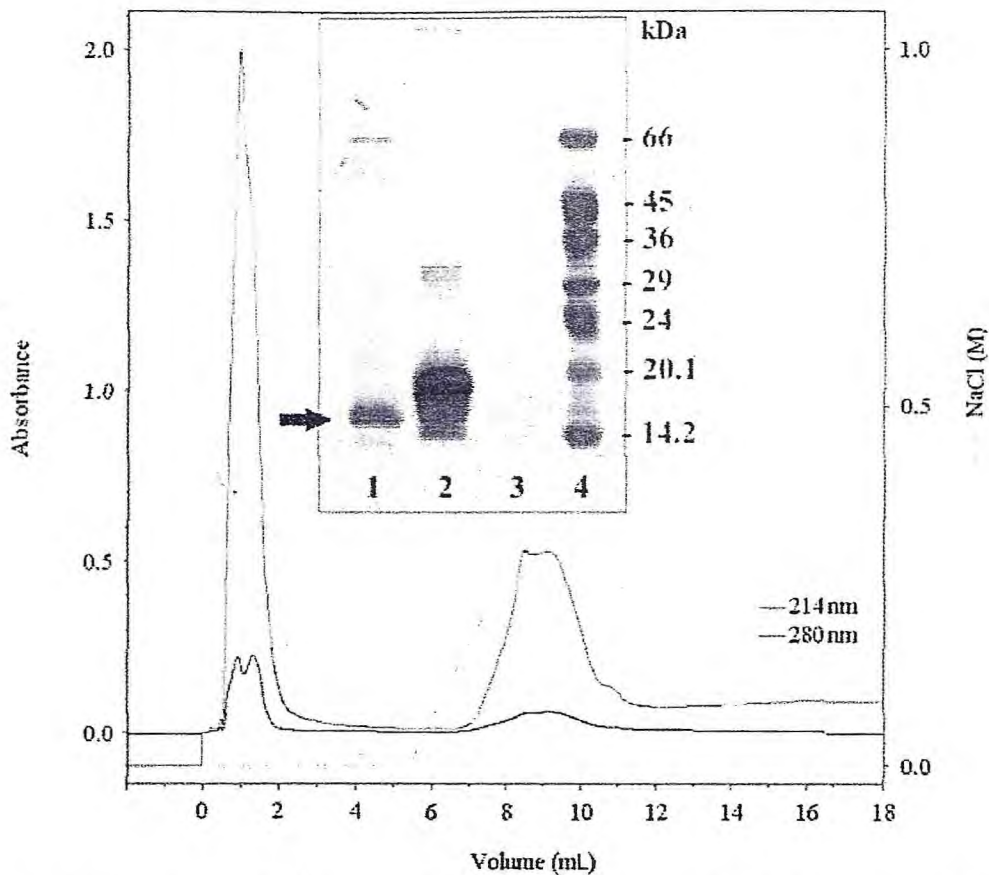


Figure 4. Heparin-Sepharose high-performance liquid chromatography pattern of DEAE-Sephacel-retained fraction. *Insert*, SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of protein fractions: *lane 1*, non-heparin-binding proteins; *lane 2*, boar spermadhesin (14 kDa); *lane 3*, heparin-binding proteins; *lane 4*, molecular mass markers: from top to bottom, bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactalbumin (14.2 kDa).

In goats, another group of proteins (GSP-14, GSP-15, GSP-20, and GSP-22 kDa) has been isolated from seminal plasma and separated according to heparin-affinity (Villemure et al., 2003). As with GSP-14 and GSP-15 kDa, BSFP also occurred in the non-heparin-binding fraction. However, based on their N-terminal amino acid sequence, BSFP and GSP are considered different proteins.

Spermadhesins from different domestic species, especially boar (Calvete et al., 1995b) and horse (Calvete et al., 1997), are obtained routinely by heparin-affinity chromatography as first step. Nevertheless, in the present study, the initial plasma fractionation by ion-exchange

chromatography was a simple and efficient approach in isolating BSFP. To our knowledge, this is a new approach to purifying a spermadhesin-family protein.

In conclusion, the present study indicates that goat seminal plasma contains a protein that is structurally related to proteins of the spermadhesin family. This protein can be efficiently isolated by ion-exchange chromatography. Further investigation of this protein would help enhance our understanding of capacitation and sperm-egg binding in goats.

ACKNOWLEDGMENTS

Research partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) and Fundação Cearense de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP-Brazil). B.S. Cavada and V.J.F. Freitas are senior investigators of CNPq.

REFERENCES

- Calvete JJ, Solis D, Sanz L, Diaz-Maurino T et al. (1993). Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *Eur. J. Biochem.* 218: 719-725.
- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L et al. (1995a). Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem. J.* 310 (Pt 2): 615-622.
- Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Raida M et al. (1995b). 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.
- Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M et al. (1996). The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett.* 399: 147-152.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C et al. (1997). Isolation and characterization of heparin and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett.* 407: 201-206.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R et al. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31: 3497-3500.
- Drickamer K and Taylor ME (1993). *Biology of animal lectins. Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 237-264.
- Einspanier R, Krause I, Calvete JJ, Töpfer-Petersen E et al. (1994). Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. *FEBS Lett.* 344: 61-64.
- Ensslin M, Calvete JJ, Thole HH, Sierralta WD et al. (1995). Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376: 733-738.
- Gabius HJ (1997). Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 243: 543-576.
- Jelinkova P, Manaskova P, Ticha M and Jonakova V (2003). Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 32: 99-107.
- Jelinkova P, Liberda J, Manaskova P, Ryslava H et al. (2004). Mannan-binding proteins from boar seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 62: 167-182.
- Jonakova V, Kraus M, Veselsky L, Cechova D et al. (1998). Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.* 114: 25-34.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leboeuf B, Restall B and Salamon S (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- 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.
- Romão MJ, Kölln I, Dias JM, Carvalho AL et al. (1997). Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. *J. Mol. Biol.* 274: 650-660.

- Saitou N and Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius HJ et al. (1993). Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 37-43.
- Shivaji S, Scheit KH and Bhargava PM (1990). Proteins of seminal plasma. Wiley-Liss Inc., New York, NY, USA.
- Solis D, Romero A, Jimenez M, Díaz-Maurino T et al. (1998). Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. *FEBS Lett.* 431: 273-278.
- Stockert RJ, Morell AG and Scheinberg IH (1974). Mammalian hepatic lectin. *Science* 186: 365-366.
- Teixeira DI, Cavada BS, Sampaio AH, Havt A et al. (2002). Isolation and partial characterization of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*), homologous to spermadhesins. *Protein Pept. Lett.* 9: 331-335.
- Ticha M, Kraus M, Cechova D and Jonakova V (1998). Saccharide-binding properties of boar AQN spermadhesins and DQH sperm surface protein. *Folia Biol.* 44: 15-21.
- Tienhai P, Suzuki K, Pertoft H, Kjellen L et al. (2000). Production of glycosaminoglycans by the porcine oviduct in relation to sperm storage. *Reprod. Domest. Anim.* 35: 167-170.
- Töpfer-Petersen E (1999). Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reprod. Update* 5: 314-329.
- Töpfer-Petersen E and Calvete JJ (1996). Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 50: 55-61.
- Töpfer-Petersen E, Calvete JJ, Sanz L and Sinowatz F (1995). Carbohydrate and heparin-binding proteins in mammalian fertilization. *Andrologia* 27: 303-324.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M et al. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30: 217-224.
- Varela PF, Romero A, Sanz L, Romão MJ et al. (1997). 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.* 274: 635-649.
- Villemure M, Lazure C and Manjumath P (2003). Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 39-49.
- Waberski D, Stüdhoff H, Hahn T, Jungblut PW et al. (1995). Advanced ovulation in gilts by the intrauterine application of a low molecular mass pronase-sensitive fraction of boar seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.* 105: 247-252.

ANEXO 4:

Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-1 (Bdh-1) registrada no GenBank

LOCUS DQ204877 608 bp mRNA linear MAH 01-OCT-2006
DEFINITION Capra hircus bodhesin (SPMD) mRNA, partial cds.
ACCESSION DQ204877
VERSION DQ204877.1 GI:77864606

KEYWORDS .
SOURCE Capra hircus (goat)
ORGANISM Capra hircus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
Pecora; Bovidae; Caprinae; Capra.

REFERENCE 1 (bases 1 to 608)
AUTHORS Freitas,V.J.F., Teixeira,D.I.A., Melo,L.M., Cunha,R.M.S.,
Cavada,B.S. and Radis-Baptista,G.
TITLE Bodhesin gene encodes a novel spermadhesin in the seminal vesicle
of domestic goat (Capra hircus)
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 608)
AUTHORS Radis-Baptista,G., Melo,L.M., Cunha,R.M.S. and Cavada,B.S.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-SEP-2005) The Laboratory of Biologically Active
Molecules - BIOMOL LAB, Federal University of Ceara Campus do Pici,
s/n, Bloco 907 Campus do Pici, PO. Box 6043, Fortaleza, CE
60455-970, Brazil
REFERENCE 3 (bases 1 to 608)
AUTHORS Teixeira,D.I.A. and Freitas,V.J.F.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-SEP-2005) Faculty of Veterinary Medicine, State
University of Ceara, Paranjana, 1700, Fortaleza, CE 60740-000,
Brazil

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..608
/organism="Capra hircus"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9925"
/tissue_type="seminal vesicle"
gene <1..608
/gene="SPMD"
CDS <1..318
/gene="SPMD"
/note="spermadhesin; seminal fluid vesicle protein; lectin
involved in sequential steps of fertilization; contains
CUB domain"
/codon_start=1
/product="bodhesin"
/protein_id="ABBO5175.1"
/db_xref="GI:77864607"
/translation="CGGVLRDFSGRISSSFWSGPKCTWTILLKSGYTVVLTIPFLSLN
CNEEDVEIIDGLPDSTTFGRLLCSGGPLVFKSSSNVMTVKYYRSSNQPVSPFDIFYER
PQA"

ORIGIN

```
1 tgtggggggg tcctcagaga cttctctggg aggatctcca gcagtttctc atggggggcca
61 aagtgtacct ggaccatcct cttgaagagc ggttatacag ttgtactgac aattccattt
121 ctacagctca actgtaatga agaggatgtg gaaatcatag acgggctgcc agacagtact
181 acatttggga ggctctgttc agggggacc cgggtgttta aatcttcttc caatgtcatg
241 accgtgaaat actacagaag ttccaaccag ccagtatctc cttttgatat atttactac
301 gagcgtccac aagcttagtg atcgtgctca cacctaagag tggacaagtg ttgccgatga
361 aaacaatctt cctggaagac tcttctggaa ccagctgacc acgaggaggg acacatcttg
421 gtcacctgtc tgatcacacc tgcccatccc atcccgtctc ctccattctt tccagccttc
481 tgtctcttcc ctgcaaagga agattgctta ctcttgagtg ttcgatactt ggccggtctt
541 gcggttcggt cattccgctt gtctttataa tcattttgaa taaagtctct ttacctgaaa
601 aaaaaaaaa
```

ANEXO 5:

Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-2 (Bdh-2) registrada no GenBank

LOCUS EF157969 607 bp mRNA linear MAM 13-JAN-2007
 DEFINITION *Capra hircus* bodhesin-2 (Bdh-2) mRNA, partial cds.
 ACCESSION EF157969
 VERSION EF157969.1 GI:121484234
 KEYWORDS .
 SOURCE *Capra hircus* (goat)
 ORGANISM *Capra hircus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Caprinae; *Capra*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 607)
 AUTHORS Melo, L.M., Cunha, R.M.S., Teixeira, D.I.A., Freitas, V.J.F.,
 Gandhi, R.-B. and Cavada, B.S.
 TITLE Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin
 family
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 607)
 AUTHORS Melo, L.M., Cunha, R.M.S., Teixeira, D.I.A., Freitas, V.J.F.,
 Gandhi, R.-B. and Cavada, B.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-DEC-2006) The Laboratory of Biologically Active -
 BioMol-Lab, Federal University of Ceara, Av. Mister Hull, sn.
 Campus do Pici. Bloco 907., Fortaleza, CE 60455-970, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..607
 /organism="Capra hircus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9925"
 /tissue_type="seminal vesicle"
 gene <1..607
 /gene="Bdh-2"
 CDS <1..318
 /gene="Bdh-2"
 /note="spermadhesin; lectin involved in reproduction;
 contains CUB domain"
 /codon_start=1
 /product="bodhesin-2"
 /protein_id="ABM54472.1"
 /db_xref="GI:121484235"
 /translation="CGGVHRDFSGRISSSFSGPKCTWTILLKSGYTWVLTIPFLSLN
 CNEEDVEIIDGLPDSTTFGRFCGGPLVFKSSSNVHTVKYYRSSNQVSPFDIFYER
 PSA"
 3' UTR 319..607
 /gene="Bdh-2"
 ORIGIN
 1 tgtggggggg tccacagaga cttctctggg aggatctcca gcagtttctc atgggggcca
 61 aagtgtacct ggaccatcct cttgaagagc ggttatacag ttgtactgac gattccattt
 121 ctccagcctca actgtaatga agaggatgtg gaaatcatag acgggctgcc agacagtact
 181 acatttggga ggttctgttc aggggggacc ctggtgttta aatcttcttc caatgtcatg
 241 accgtgaaat actacaggag ttccaaccag ccagtatctc cttttgatat attttactac
 301 gagcgtccat cagcttagtg atcatgctca cacctaagag tggacaagtg ttgccgatga
 361 aaacaatctt cctggaagac tcttctggaa ccagctgacc acgaggaggg acacatcttg
 421 gtcacctgtc tgatcacacc tgcccattcc atcccgtctc ctccattctt tccagccttc
 481 tgtctcttcc ctgcaaagga agattgctta ctccctgagtg ttcgatactt gccggctctg
 541 cggttcggtc attcggcttg tctttataat cattttgaat aaagtctctt tacctgaaaa
 601 aaaaaaa

ANEXO 6:

Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-3 (Bdh-3) registrada no GenBank

LOCUS EF157970 606 bp mRNA linear MAM 13-JAN-2007
 DEFINITION *Capra hircus* bodhesin-3 (Bdh-3) mRNA, partial cds.
 ACCESSION EF157970
 VERSION EF157970.1 GI:121484236
 KEYWORDS .
 SOURCE *Capra hircus* (goat)
 ORGANISM *Capra hircus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Caprinae; *Capra*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 606)
 AUTHORS Melo, L.M., Cunha, R.M.S., Teixeira, D.I.A., Freitas, V.J.F.,
 Gandhi, R.-B. and Cavada, B.S.
 TITLE Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin
 family
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 606)
 AUTHORS Melo, L.M., Cunha, R.M.S., Teixeira, D.I.A., Freitas, V.J.F.,
 Gandhi, R.-B. and Cavada, B.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-DEC-2006) The Laboratory of Biologically Active -
 BioMol-Lab, Federal University of Ceara, Av. Mister Hull, sn.
 Campus do Pici. Bloco 907., Fortaleza, CE 60455-970, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..606
 /organism="Capra hircus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9925"
 /tissue_type="seminal vesicle"
 gene <1..>606
 /gene="Bdh-3"
 CDS <1..318
 /gene="Bdh-3"
 /note="spermadhesin; lectin involved in reproduction;
 contains CUB domain"
 /codon_start=1
 /product="bodhesin-3"
 /protein_id="ABM54473.1"
 /db_xref="GI:121484237"
 /translation="CGGVLRDFSGRISSFSWGPCKTWTILLKSGYTVVLTIPFLSLN
 CNEEDVEIIDGLPDSTIFGKFCGGPLVFKSSSNVMTVKYYRSSNQVSPFDIFYER
 PQA"
 3' UTR 319..>606
 /gene="Bdh-3"
 ORIGIN
 1 tgtgggggcg tctcagaga cttctctggg aggatctcca gcagtttctc atgggggcca
 61 aagtgtacct ggaccatcct cttgaagagc ggttatacag ttgtactgac gattccattt
 121 ctcagcctca actgtaatga agaggatgtg gaaatcatag acgggctgcc ggacagtact
 181 acatttggga agttctgttc agggggaccc ctggtgttta aatcttcttc caatgtcatg
 241 accgtgaaat actacagaag ttccaaccag ccagtatctc cttttgatat attttactac
 301 gagcgtccac aagcttagtg atcgtgctca cacctaagag tggacaagtg ttgccgatga
 361 aaacaatctt cctggaagac tcctctggaa ccagctgacc acgaggaggg acacatcttg
 421 gtcacctgtc tgatcacacc tgcccatccc atcccgtctc ctccattctt tccagccttc
 481 tgtctcttcc ctgcaaagga agattgctta ctctgagtg ttcgatactt gccggtcttg
 541 cggttcggtc attccgcttg tcttataatc attttgaata aagtctcttt acctgaaaaa
 601 aaaaaa

ANEXO 7:

Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-4 (Bdh-4) registrada no GenBank

LOCUS EF157971 477 bp mRNA linear MAM 13-JAN-2007
 DEFINITION Capra hircus bodhesin-4 precursor (Bdh-4) mRNA, complete cds.
 ACCESSION EF157971
 VERSION EF157971.1 GI:121484238
 KEYWORDS .
 SOURCE Capra hircus (goat)
 ORGANISM Capra hircus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Caprinae; Capra.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 477)
 AUTHORS Melo,L.M., Cunha,R.M.S., Teixeira,D.I.A., Freitas,V.J.F.,
 Gandhi,R.-B. and Cavada,B.S.
 TITLE Buck (Capra hircus) genes encode new members of the spermadhesin
 family
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 477)
 AUTHORS Melo,L.M., Cunha,R.M.S., Teixeira,D.I.A., Freitas,V.J.F.,
 Gandhi,R.-B. and Cavada,B.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-DEC-2006) The Laboratory of Biologically Active -
 BioMol-Lab, Federal University of Ceara, Av. Mister Hull, sn.
 Campus do Pici. Bloco 907., Fortaleza, CE 60455-970, Brazil
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..477
 /organism="Capra hircus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9925"
 /tissue_type="seminal vesicle"
gene <1..>477
 /gene="Bdh-4"
5' UTR <1..69
 /gene="Bdh-4"
CDS 70..474
 /gene="Bdh-4"
 /note="spermadhesin; lectin involved in reproduction;
 contains CUB domain"
 /codon_start=1
 /product="bodhesin-4 precursor"
 /protein_id="ABM54474.1"
 /db_xref="GI:121484239"
 /translation="MKLSSVIPWALLLSTATLVSTESDEDTRKCGGVHRDFSGRISS
 FSWGPKCTWTILLKSGYTVVLTIPFLSLNCNEEDVEIIDGLPDSTTFGRFCSSGGLVF
 KSSSNVMTVKYYRSSNQVSPFDIFYERPTA"
sig_peptide 70..132
 /gene="Bdh-4"
3' UTR 475..>477
 /gene="Bdh-4"
 ORIGIN
 1 gcnnacgtgt ttgtatcttg tacgtgggcc cggtgngncg gntgctgagg ctggtgccag
 61 gctgccaaga tgaagctgct cagcgtcatc ccttgggcct tgctgctcag cacagccaca
 121 ctggttcaa cagaatcgga tgaagacact agaaaatgtg ggggcgtcca cagagacttc
 181 tctgggagga tctccagcag tttctcatgg gggccaaagt gtacctggac catcctcttg
 241 aagagcggtt atacagttgt actgacaatt ccatttctca gcctcaactg taatgaagag
 301 gatgtggaaa tcatagacgg gctgccagac agtactacat ttgggaggtt ctgttcaggg
 361 ggacccttgg tgtttaaatc ttcttccaat gtcctgaccg tgaaatacta cagaagttcc
 421 aaccagccag tatctccttt tgatatattt tactacgagc gtccaacagc ttagtga

ANEXO 8:

**Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-1 (Bdh-1) em vetor de expressão
pTrcHis -TOPO**

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment
 (Clone pTrc-His/SMD21 - Bodhesin-1)

```

-----TAAGGAGGA-TAA--CATGGGGCGGTCTCATCATCATCATCATCATGGTATG 49
CGATTAAATAAGGAGGAATAAACCATGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATG 60
*****
GCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGAT 109
GCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGAT 120
*****
CCRACCCCTTTGTGGGGGCGTCCAGAGACTTCTCTGGGAGGATCTCCAGCAGTTTCTCA 169
CCRACCCCTTTGTGGGGGCGTCCAGAGACTTCTCTGGGAGGATCTCCAGCAGTTTCTCA 180
*****
TGGGGGCCAAAGTGTACCTGGACCATCCTCTTGAAGAGCGGTTATACAGTTGTAAGTACA 229
TGGGGGCCAAAGTGTACCTGGACCATCCTCTTGAAGAGCGGTTATACAGTTGTAAGTACA 240
*****
ATTCCATTTCTCAGCCTCAACTGTAATGAAGAGGATGTGGAAATCATAGACGGGCTGCCA 289
ATTCCATTTCTCAGCCTCAACTGTAATGAAGAGGATGTGGAAATCATAGACGGGCTGCCA 300
*****
GACAGTACTACATTTGGGAGGCTCTGTTCAGGGGGACCCCTGGTGTTTAAATCTTCTTCC 349
GACAGTACTACATTTGGGAGGCTCTGTTCAGGGGGACCCCTGGTGTTTAAATCTTCTTCC 360
*****
AATGTCATGACCGTGAAATCTACAGAAGTTCCAACCAGCCAGTATCTCCTTTTGATATA 409
AATGTCATGACCGTGAAATCTACAGAAGTTCCAACCAGCCAGTATCTCCTTTTGATATA 420
*****
TTTTACTACGAGCGTCCAGCAGCTTAGTGAAAGGGCGAATTGGAAGCTTGGCTGTTTTGG 469
TTTTACTACGAGCGTCCAGCAGCTTAGTGAAAGGGCGAATTGGAAGCTTGGCTGTTTTGG 477
*****
CGGATGAGAGAGATTTGAGCCTGATACAGA 500
CGA----- 480
**

```

Letras sublinhadas = vetor pTrcHis-TOPO1; Letras em caixa cinza = seqüências nucleotídicas que codificam resíduos de aminoácidos diferentes entre as bodesinas. A janela de leitura do inserto de cDNA apresenta-se em seqüência com a do vetor plasmidial, permitindo a adequada expressão da proteína codificada.

ANEXO 9:

Seqüência nucleotídica do cDNA da Bodesina-2 (Bdh-2) em vetor de expressão
pTrcHis -TOPO

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment
(Clone pTrc-His/SMD46 - Bodhesin-2)

```

-----AGGATAA--CATGGGGCGGTTCTCATCATCATCATCATCATG 40
GTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACCTGGGG-GGTTCTCATCATCATCATCATCATG 59
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

GTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTGGGGATCTGTACGACGATGACGATA 100
GTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTGGGGATCTGTACGACGATGACGATA 119
*****

AGGATCCAACCCCTTTGTGGGGGGGTCCACAGAGACTTCTCTGGGAGGATCTCCAGCAGTT 160
AGGATCCAACCCCTTTGTGGGGGGGTCCACAGAGACTTCTCTGGGAGGATCTCCAGCAGTT 179
*****

TCTCATGGGGGCCAAAGTGTA CCTGGACCATCCTCTTGAAGACGGTTATACAGTTGTAC 220
TCTCATGGGGGCCAAAGTGTA CCTGGACCATCCTCTTGAAGACGGTTATACAGTTGTAC 239
*****

TGACGATTCCATTTCTCAGCCTCAA CTGTAATGARGAGGATGTGGAAATCATAGACGGGC 280
TGACGATTCCATTTCTCAGCCTCAA CTGTAATGARGAGGATGTGGAAATCATAGACGGGC 299
*****

TGCCAGACAGTACTACATTTGGGAGGTTCTGTT CAGGGGGACCCCTGGTGTTTAAATCTT 340
TGCCAGACAGTACTACATTTGGGAGGTTCTGTT CAGGGGGACCCCTGGTGTTTAAATCTT 359
*****

CTTCCAATGTCATGACC GTGAAATACTACAGGAGTTC CAACCAGCCAGTATCTCCTTTTG 400
CTTCCAATGTCATGACC GTGAAATACTACAGGAGTTC CAACCAGCCAGTATCTCCTTTTG 419
*****

ATATATTTTACTACGAGCGTCCAGCAGCTTAGT GAAAGGGCGAATTCGAAAGCTTGGCTGT 460
ATATATTTTACTACGAGCGTCCAGCAGCTTAGT GAAAGGGCGAATTCGAAAGCT-GGCTGT 478
*****

TTTGGCGGATGAGAGAA GATTTTCAGCCTGTACA 494
TT--GCCA----- 484
**  ***

```

Letras sublinhadas = vetor pTrcHis-TOPO1; Letras em caixa cinza = seqüências nucleotídicas que codificam resíduos de aminoácidos diferentes entre as bodesinas. A janela de leitura do inserto de cDNA apresenta-se em seqüência com a do vetor plasmidial, permitindo a adequada expressão da proteína codificada.