

## ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ESPECTROMETRIA DE MASSA COMO FERRAMENTAS PROTEÔMICAS APLICADAS À DEFINIÇÃO DE MARCADORES PROTEICOS ASSOCIADOS À EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE CAPRINOS

*[Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry as proteomic tools applied to the definition of protein markers associated with reproductive efficiency goats]*

Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior<sup>1\*</sup>, Gabrielle Rosembli Martins<sup>1</sup>, Igor Ciríaco Barroso<sup>1</sup>, Rebeca Cavalcante Marinho<sup>1</sup>, Tereza D'Ávila de Freitas Aguiar<sup>1</sup> e Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup> Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Virologia, Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi, CEP 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil.

**RESUMO** - O crescimento e desenvolvimento do rebanho caprino no Nordeste são observados com o aumento na produção da pecuária do Brasil. Esse aumento é reflexo, a princípio, das maiores exigências do mercado consumidor por produtos de melhor qualidade obtidos a partir de rebanhos de alto padrão zootécnico. As pesquisas atuais ilustram a necessidade de dispor de biomarcadores que auxiliem a indicação do potencial reprodutivo dos animais, uma vez que isso não pode ser expresso apenas com o exame andrológico. A avaliação da expressão das proteínas, tomando-as como biomarcadores, é análise potencial uma vez que estas, dentre os constituintes do plasma seminal, são encontradas em maior quantidade na forma de complexos associados, desempenhando papel crucial em todos os processos relacionados à capacidade fecundante dos espermatozoides. Essa análise é realizada por métodos de separação e detecção simultânea de proteínas utilizando técnicas como a eletroforese bidimensional (2DE) ou cromatografias, acoplados a métodos cada vez mais eficientes e sensíveis de identificação e quantificação de níveis de expressão de proteínas por espectrometria de massas. O objetivo desta revisão é abordar sobre a técnica de eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa como ferramenta na análise da expressão de proteínas dentro do campo da proteômica.

**Palavras-Chave:** proteínas, plasma seminal, eletroforese 2DE, espectrometria de massa.

**ABSTRACT** - The growth and development of goat herds in the northeast are being observed due to the increase in livestock production in Brazil. This increase reflects demands of the consumer market for high quality product, which are obtained from flocks of high standard zootechnics. Current research illustrates the need for biomarkers that indicate an animal's reproductive potential, since this cannot be expressed solely with andrologic evaluation. For this reason, the expression of the proteins as biomarkers is a potential analysis. The proteins from the seminal plasma constituents are found in larger amounts in the form of associated complexes, playing a crucial role in all processes related to the fertilizing capacity of sperm. This analysis is performed by separation methods and simultaneous detection of proteins using techniques such as two-dimensional electrophoresis (2DE) or chromatography. These techniques are coupled with methods to identify and quantify expression levels of proteins by mass spectrometry that are increasingly efficient and sensitive. The aim of this review was to discuss the technique of two-dimensional electrophoresis combined with mass spectrometry as a tool in the analysis of protein expression within the field of proteomics.

**Keywords:** proteins, seminal plasma, 2D electrophoresis, mass spectrometry.

### INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento do rebanho caprino no Nordeste são observados com o aumento

na produção da pecuária do Brasil. Esse aumento é reflexo, a princípio, das maiores exigências do mercado consumidor por produtos de melhor qualidade obtidos a partir de rebanhos de alto padrão

\* Autor para correspondência. E-mail: [junior\\_medvet2009@hotmail.com](mailto:junior_medvet2009@hotmail.com)

zootécnico. A escolha desses animais para a composição e formação das bases dos rebanhos seguem critérios rigorosos, onde a eficiência reprodutiva consiste em um dos principais objetivos de seleção utilizados nos atuais sistemas de produção animal, por ser essencial à lucratividade (Matos et al., 1992).

A seleção é feita adotando muitos critérios de avaliação reprodutiva essenciais à escolha de reprodutores caprinos, abordados pelo exame andrológico completo. Esse exame é a soma de fatores inerentes à reprodução como idade, puberdade, qualidade do sêmen, perímetro escrotal e libido, e está devidamente suportado por condição física adequada que permita pôr em prática os processos que culminam com a monta (Martins, 2002).

As pesquisas atuais veem a necessidade de dispor de biomarcadores que auxiliem a indicação do maior potencial reprodutivo dos animais, uma vez que isso não pode ser expresso apenas com o exame andrológico. Jobim et al. (2009) explicam que as análises bioquímicas, associadas aos critérios de avaliação espermática, poderiam auxiliar na identificação de diferenças do potencial de fertilidade importantes entre os animais selecionados.

Acredita-se que a avaliação da expressão das proteínas seminais, tomando-as como biomarcadores, seja análise potencial, uma vez que estas, dentre os constituintes do plasma seminal, são encontradas em maior quantidade na forma de complexos associados, desempenhando papel crucial em todos os processos relacionados à capacidade fecundante dos espermatozoides. A composição, a conformação e o tamanho dessas proteínas são específicos para cada espécie e elas são estáveis, dependendo das condições do sêmen (Jelínková et al., 2003). Considerando a grande relevância econômica que a espécie caprina representa especialmente para o Nordeste brasileiro, aliado ao aproveitamento ainda incipiente de sua capacidade reprodutiva, é de extrema importância o uso de ferramentas que complementem os estudos voltados à análise da função reprodutiva no rebanho caprino.

A avaliação da expressão dessas proteínas pode ser realizada por meio de técnicas proteômicas que visam o estudo em larga escala e baseiam-se, por exemplo, em métodos de separação e detecção simultânea de proteínas utilizando técnicas como a eletroforese bidimensional (2DE) ou cromatografias acopladas a métodos cada vez mais eficientes e sensíveis de identificação e quantificação de níveis

de expressão de proteínas por espectrometria de massa (Wittmann-Lieboldt et al., 2006).

O objetivo desta revisão é abordar sobre a técnica de eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa aplicada à definição de marcadores proteicos relacionados à eficiência reprodutiva de caprinos.

## PROTEÔMICA

O proteoma, segundo Wasinger et al. (1995), consiste no conjunto de proteínas expressas por um organismo em um dado momento. Compreende tanto técnicas para estudo em larga escala de proteínas expressas (proteoma) como as aplicações destas técnicas para a análise dos problemas biológicos. A proteômica é o método direto para identificar, quantificar e estudar as modificações pós traducionais das proteínas em uma célula, tecido ou mesmo organismos. Há forte e sinérgica correlação entre os estudos proteômicos e genômicos uma vez que investigam a organização celular ao nível complementar, proteínas e genes, fornecem informações que aumentam suas eficiências (Souza et al., 1999).

Diversos estudos sobre proteoma baseiam-se em métodos de separação e detecção simultânea de proteínas utilizando técnicas como a eletroforese bidimensional (2D-PAGE) ou cromatografias, acoplados a métodos cada vez mais eficientes e sensíveis de identificação e quantificação de níveis de expressão de proteínas por espectrometria de massas (Wittmann-Lieboldt et al., 2006).

Vispo (2004) explica que a análise proteômica inclui diversos campos de pesquisa, sendo eles: identificação de proteínas expressas por um organismo numa determinada condição (proteômica descritivas ou estruturais); identificação de alterações no nível de expressão da proteína associado com alterações nas condições dos organismos (proteômica comparativa); os conjuntos de identificação funcionais de proteínas, isto é, grupo de proteínas que estão localizadas em mesmo sítio celular e operando em mútua interação (interação proteína-proteína, proteômica funcionais); e identificação de proteínas que formam uma organela (esta abordagem leva ao desenvolvimento de um mapa molecular da célula).

Existem várias plataformas proteômicas disponíveis no momento. Um fluxo de trabalho típico de uma plataforma geralmente consiste em subsequente preparação da amostra, ou extração; separação de proteínas ou pré-fracionamento; o perfil

comparativo de expressão de proteínas; a digestão proteolítica e análise de massa; a identificação da proteína através da correspondente base de dados ou sequenciamento de proteína; e, finalmente, a validação da proteína e caracterização bioquímica (He & Chiu, 2003). As técnicas comumente utilizadas na proteômica visam o estudo em larga escala de proteínas e complexos proteicos.

A realização dessas técnicas demanda, inicialmente, investimento alto quanto à infraestrutura do laboratório, assim como material de consumo e mão-de-obra especializada; sendo ainda uma metodologia nova, mas com aplicação concisa e positiva para as pesquisas futuras.

### ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2DE)

Os fundamentos da eletroforese bidimensional foram introduzidos em 1975 por Klose, em Berlim, e O'Farrell, nos Estados Unidos. A técnica resulta da combinação da focalização isoeletrica e da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. As proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico pela focalização isoeletrica, na primeira dimensão e, na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares.

A SDS-PAGE, eletroforese unidimensional, consiste em um método para a separação de polipeptídios de acordo com os seus pesos moleculares. A técnica é realizada em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) (Berkelman & Stenstedt, 1998). A eletroforese 2DE apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas enquanto que na SDS-PAGE as bandas proteicas tendem a se sobrepor, os métodos unidimensionais de separação, podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A eletroforese bidimensional, ao combinar dois processos distintos de separação pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas num único gel (Anderson & Anderson, 1996, Galdos, 2009). É amplamente utilizada, mas principalmente para experimentos qualitativos este método é insuficiente para a sua reprodutibilidade, incapaz de detectar proteínas em baixa abundância e hidrofóbica, baixa sensibilidade na identificação de proteínas com valores de pH muito baixo ( $\text{pH} < 3$ ) ou muito alto ( $\text{pH} < 10$ ) e massas moleculares muito pequenas ( $M_r < 10$  kD) ou muito grande ( $M_r > 150$  kD) (Baltimore, 2001; Alaoui-Jamali & Xu, 2006).

#### *Etapas da eletroforese bidimensional*

As etapas de análise de expressão de proteínas por 2DE (Figura 1), segundo Vispo (2004), consistem

em: **1) preparação da amostra** – eliminação dos componentes não proteicos e obtenção de subfrações celulares caso necessário; **2) separação por ponto isoeletrico** – duas técnicas (a escolher): separação gel de anfolina (separação em tubos) ou gel de imobilinas (separação em tiras IPG). Em ambos os casos, a focalização transcorre durante um período prolongado a alta tensão (durante 10 a 20 horas a uma tensão entre 3,5 e 8 KW); **3) separação por tamanho** – o gel contendo a primeira separação é colocado perpendicularmente à direção de migração em um segundo gel; **4) detecção** – permite ver as proteínas no gel como manchas (spots) e capturar as imagens de separação utilizando um scanner, algumas técnicas de detecção são incompatíveis com o seguinte passo de análise e identificação; **5) análise das imagens dos géis** – identifica as alterações na expressão de proteínas entre duas ou mais condições experimentais diferentes, comparando vários genes de cada condição; **6) seleção das proteínas de interesse** – seleciona as proteínas cujas alterações são: significativas e reproduzíveis em um grupo de experimentos idênticos; **7) recortar seções do gel com proteínas selecionadas** – permite a utilização para preparações do mapa bidimensional: pequenos cilindros de gel contendo as proteínas identificadas são cortados; **8) digerir proteínas em blocos de gel com uma protease específica** – incubação dos blocos de géis com tripsina durante 3-20 horas. Obtém-se uma mistura de peptídeos tripticos; **9) analisar as misturas de peptídeos por espectrometria de massa** – obtém-se as massas moleculares dos peptídeos obtidos e pode, ainda, obter sequências parciais ou completas de peptídeos; **10) identificação por comparação das bases de dados das proteínas** – os valores das massas obtidos são comparados com bases de dados das digestões virtuais do proteoma teórico do organismo analisado, se seu genoma é conhecido, quando o genoma não é conhecido, comparam-se os valores com a digestões virtuais de proteomas derivados de genomas conhecidos procedentes de espécies estreitamente relacionadas.

#### *1. Coleta de sêmen, preparação da amostra e determinação de proteínas totais.*

Em caprinos, a coleta de sêmen pode ser realizada através do uso de vagina artificial ou eletroejaculação. A vagina artificial é o método mais próximo da monta natural, mimetizando as condições de pressão e temperatura da vagina da cabra (35 °C), sendo, portanto, o mais utilizado em caprinos. Este método, durante a coleta, necessita de um manequim, fêmea que se encontre no cio para

despertar maior interesse por parte do macho. No momento que o animal monta, faz-se o desvio do pênis introduzindo-o na vagina artificial, sendo o sêmen ejaculado no interior desta. O sêmen coletado deve ser protegido da luz (solar), sujidades (poeira) e evitar agitações bruscas que venham a alterar e afetar o ejaculado (Lima, 2000) in (Granados et al., 2006). A eletroejaculação é um método pouco usado na espécie ovina e caprina, pois o sêmen é de baixa concentração e qualidade, além de ir contra os

princípios do bem estar animal, sendo condenado pela sociedade protetora dos animais. Este método, atualmente é utilizado em animais, que estejam impossibilitados de montar por um defeito não genético nos apêndices. Consiste na introdução do eletroejaculador no ânus do macho, e por meio de descargas elétricas leves, promove a ejaculação (Granados et al., 2006).

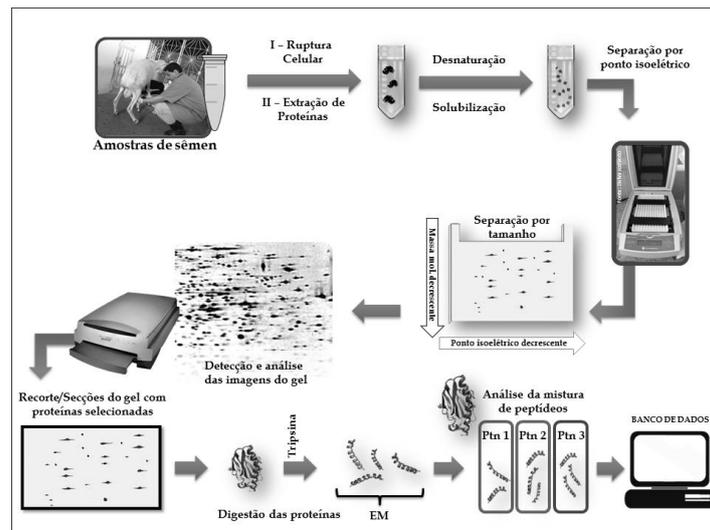


Figura 1. Análise de expressão de proteínas do sêmen por eletroforese bidimensional. Fonte: arquivo pessoal (adaptado de Vispo, 2004).

A 2DE, segundo Figeys (2005) é normalmente usada em estudos para perfis proteômicos, com o objetivo de mostrar, principalmente, diferentes proteínas expressas em diferentes condições. Acontece que a conservação do proteoma para a obtenção de um padrão verdadeiramente representativo na 2DE não é trivial, e este, por exemplo, é um grande cuidado a ser tomado durante a extração de células do seu ambiente e durante a lise das células para reduzir a influência dos protocolos de extração da amostra observada no proteoma. Os erros são muitas vezes feitos ao manipular um proteoma, afetando seriamente as conclusões dos experimentos. Portanto a história da amostra é um pré-requisito a fim de avaliar a validade de uma amostra. O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas é variável por amostra e deve ser estabelecido para cada caso em particular (Herbert, 1999), neste caso, o plasma seminal.

No processamento das amostras, explicam Berkelman & Stenstedt (1998), é importante seguir diretrizes gerais, sendo elas:

1. Manter o protocolo de preparação da amostra tão simples quanto possível para evitar perdas de proteínas. A adição de passos à preparação da amostra pode melhorar a qualidade do resultado final na 2DE, porém com possíveis perdas de proteínas seletivas.
2. As células ou tecidos devem sofrer lise, de tal maneira a minimizar a proteólise e outras formas de degradação da proteína. A lise celular deve ser feita a mais baixa temperatura possível e com mínima geração de calor. O rompimento celular deve ocorrer em solução fortemente desnaturante contendo inibidores de proteases.
3. Solução de preparo da amostra deve ser preparada ou armazenada congelada em alíquotas. Use uréia deionizada ou de elevada pureza.
4. Preservar a qualidade da amostra preparando-a apenas antes da IEF ou armazená-las em alíquotas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Não expor a amostra a repetidos descongelamentos.
5. Remover por ultracentrifugação todo o material precipitado. As partículas sólidas e os

lipídeos dever ser removidos, pois bloqueiam os poros do gel. No sêmen, para separação das partes e obtenção do plasma, explica Teixeira et al. (2009), deve-se centrifugar as amostras a 10.000 g, durante 3<sup>o</sup> minutos a 4 °C. Após a separação o sobrenadante será aliqüotado em tubo eppendorf e mantido a -4 °C até o ensaio experimental

6. Para evitar alteração de proteínas, nunca aquecer uma amostra após a adição de uréia. Quando a amostra contém uréia, a temperatura não devem exceder 37 °C. Elevada temperatura faz com que a uréia hidrolise formando o isocianato e este, por sua vez, ocasiona a carbamilação em proteínas, prejudicando a análise.

Existem vários métodos para a determinação de proteínas totais (Quadro 1), que foram desenvolvidos para diferentes amostras, tais como células bacterianas (Biureto), proteínas dissolvidas (Bradford), soluções que contenham detergentes (BCA – Ácido Bicinconínico), proteína pura (absorção por UV), alimentos (Biureto, Lowry, Bradford), plasma sanguíneo (Biureto, Lowry, Bradford), plantas (Lowry), explicam Miwa et al. (2008). Dos métodos propostos para a determinação de proteínas totais, não se pode adotar um como ideal e/ou melhor, o método escolhido é aquele que se adequa a suas necessidades e condições, correlacionando-se o tipo de amostra analisada.

Quadro 1. Principais métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas totais.

MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	PRINCÍPIO	ABSORBÂNCIA
1. Biureto	Interação entre o sulfato de cobre e hidróxido de sódio com tartarato de sódio, que estabiliza o cobre em solução (Gornall et al., 1949). Explica Zaias et al. (1998) que o cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto de reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm.	Leitura de absorbância em 310 nm e limite de detecção de $1 \times 10^{-3}$ mg.L <sup>-1</sup> (Wilson & Walker, 1995).
2. Lowry	Redução dos constituintes ativos do reagente Folin-Ciocalteu (mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico) quando reage com as proteínas na presença de um catalisador cobre (II), produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm (Zaias et al., 1998)	Limite de detecção é de $1 \times 10^{-5}$ mg.L <sup>-1</sup> (Wilson & Walker, 1995).
3. Coomassie Brilliant Blue BG-250 (Reagente de Bradford)	Interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue (CBB) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Segundo Zaias et al (1998), no pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.	Leitura a 595 nm (Bradford, 1976) e limite de detecção de $2 \times 10^{-5}$ mg.L <sup>-1</sup> (Wilson & Walker, 1995).
4. BCA (Ácido Bicinconínico)	Formação de complexo colorido com BCA, pela redução do Cu <sup>+2</sup> , em meio alcalino, com proteínas (Zaias et al., 1998).	Leitura a 562 nm (Smith et al., 1985) e limite de detecção de $5 \times 10^{-7}$ mg.L <sup>-1</sup> (Wilson & Walker, 1995).
5. Absorção por UV	As proteínas mostram absorção na região de 280 nm na região abaixo de 220 nm, sendo a 1 <sup>o</sup> devido a diversos aminoácidos (fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina) e, a segunda devido à ligação peptídica (Stoscheck, 1990) in (Zaias et al., 1998).	-

## 2. Primeira dimensão: focalização isoeétrica (IEF)

A IEF consiste no primeiro passo da 2DE. As proteínas são separadas de acordo com as diferenças dos seus pontos isoeletrônicos. Uma vez submetidas a

um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu ponto isoeletrico (pI) e neste ponto ficarão com carga total neutra, interrompendo a migração no gel (Berkelman & Stenstedt, 1998).

### 3. Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

O segundo passo da 2DE é a SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida). Consiste em um método de separação eletroforético de acordo com os seus pesos moleculares (MW - *Mass weight*). A técnica é realizada em gel de poliacrilamida contendo o detergente SDS (sodium dodecyl sulfate). É um detergente aniônico que desnatura as proteínas por envolvimento em torno do esqueleto polipeptídico, numa proporção de 1,4 gramas de proteína por grama de SDS. A ligação com o SDS mascara a carga das próprias proteínas formando complexos aniônicos com constante carga líquida negativa por unidade de massa (Berkelman & Stenstedt, 1998). Além disso, a conformação nativa da proteína é totalmente alterada na presença do SDS, de tal forma que a maioria das proteínas assume configurações similares, e, portanto um valor similar da razão: carga/massa. Assim, a eletroforese na presença de SDS separa as proteínas, levando-se em consideração exclusivamente as suas massas moleculares (Lehninger et al., 1993).

### 4. Análise dos géis

Para observar os *spots*, as proteínas nos géis bidimensionais, é necessário o uso de técnicas de detecção e identificação de proteínas. As proteínas separadas eletroforéticamente podem ser visualizadas por métodos gerais de coloração, tais como azul brilhante de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue - CBB*), nitrato de prata, fluorescência ou autorradiografia, ou por métodos específicos como a coloração de glicoproteínas ou detecção com imunoquímicos (Klein et al., 2004; Santos et al., 2004; Westemeier & Naven, 2002). A escolha (visualização/detecção) depende, entre outros fatores, da quantidade de proteína a carregar na tira de focagem visto que, por exemplo, a coloração com azul de Coomassie é menos sensível que a coloração por nitrato de prata, exigindo, como tal, uma maior quantidade de amostra para que as proteínas sejam devidamente visualizadas. Apesar disso, a coloração com azul de Coomassie tem a vantagem de permitir uma melhor quantificação da abundância relativa de cada proteína (devido à reduzida gama dinâmica - gama de linearidade entre intensidade do spot e concentração de proteína - da coloração com a prata) e garantir a existência de quantidade suficiente de proteína para a sua subsequente identificação. Caso as proteínas tenham sido marcadas com radioisótopos, a sua detecção é realizada por autorradiografia. Este método é muito sensível e apresenta uma gama de linearidade entre intensidade do sinal e concentração de proteína bastante

alargada, tornando-se crucial quando o sistema biológico em estudo não permite a obtenção de grandes quantidades de proteína (Santos et al., 2004). Geralmente o azul brilhante de Coomassie e o Nitrato de prata são os mais utilizados na rotina nos laboratórios. A popularidade do CBB deve-se, principalmente, ao seu fácil manuseio e baixo custo, apresentando razoável sensibilidade ( $\sim 0,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) (Groth et al., 1963).

Explica Santo et al. (2004), que após a coloração ou marcação das proteínas, a intensidade de cada *spot* de proteína detectada nos géis é registrada, informaticamente, sob forma de imagem. Essa informação é posteriormente tratada usando *software* adequado à quantificação e análise comparativa da intensidade dos vários *spots* obtidos nos géis 2DE. No mercado existem várias soluções de *software*, desenvolvidas para a análise de resultados obtidos em géis 2DE (ex.: Phoretix 2D, Nonlinear Dynamics; PDQuest, Biorad; Melanie, GeneBio; Decyder, Amersham Biosciences). Estes permitem padronizar as diferenças existentes de gel para gel (através de métodos de normalização), quantificar e comparar a intensidade (quantidade) relativa de cada proteína presente nos diferentes géis etc.

### 2. Espectrometria de Massa

Em 1897, J. Thomson descobriu os elétrons, recebendo o Prêmio Nobel de Física nove anos mais tarde por sua descoberta (Thomson et al., 1921). Em 1918, Arthur J. Dempster desenvolveu o primeiro espectrômetro moderno, e fez a importante descoberta do isótopo  $^{235}\text{U}$ . Em 1919, Francis W. Aston também desenvolveu e melhorou seu espectrômetro de massas, o que lhe permitiu descobrir 212 isótopos naturais, recebendo em 1922 o Prêmio Nobel de Química pela sua pesquisa. Os conceitos desenvolvidos por Arthur J. Dempster e Francis W. Aston são utilizados até hoje no desenvolvimento dos modernos espectrômetros de massa (Budzikiewicz & Grigsby, 2006; Dass, 2007).

A espectrometria de massa (EM) é uma técnica que permite avaliar a massa molecular dos compostos e quantificá-los, identificar compostos desconhecidos, revelar a estrutura de moléculas e determinar as modificações pós-traducionais, ou seja, aplicada à análise de biomoléculas ela fornece uma informação precisa da massa molecular, identifica proteínas usando a massa molecular de peptídeos tripticos, informação estrutural, sequenciamento de peptídeos, identifica modificações pós-traducionais.

A EM é uma ferramenta usada em estudos de proteômica para a identificação de proteínas. Seu

princípio é semelhante ao que acontece quando um feixe de luz incidente sobre um prisma: a radiação eletromagnética é decomposta ou separada de acordo com diferentes comprimentos de onda. Em um espectrômetro de massa o feixe de íon é separado de acordo com a razão massa/carga:  $m/z$  (Vispo, 2004). Pode ser utilizada em análises quantitativas, mas é em análises qualitativas que ela tem se destacado, como na identificação de compostos em misturas e, principalmente, na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, que pode ser alcançado através da formação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmentos (Souza, 2008).

O espectrômetro de massa é um instrumento sofisticado constituído de três partes: fonte de ionização, muitas vezes denominada de interface, analisador de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados (Collins et al., 2006). As fontes de íons consistem na parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, transformação de moléculas neutras em íons; os analisadores de massas são a parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com seu  $m/z$ , realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos; e os detectores são parte final de um espectrômetro de massas, sendo responsável pela detecção e amplificação dos íons (Souza, 2008).

A fonte de ionização de elétrons (EI), anteriormente chamada de impacto de elétrons, foi concebida por Dempster e melhorado por Bleakney (1929) e Nier (1947). É amplamente utilizada em espectrometria de massa orgânica. Esta técnica de ionização funciona bem para muitas moléculas em fase gasosa, mas induz a fragmentação extensa, de modo que os íons moleculares nem sempre são observados (Hoffmann & Stroobant, 2007).

A EI leva à fragmentação do íon molecular, o que às vezes impede a sua detecção. Ionização química (CI) é uma técnica que produz íons com pequeno excesso de energia. Assim, esta técnica apresenta a vantagem de produzir um espectro com menor fragmentação no qual a espécie molecular é facilmente reconhecida. Consequentemente, ionização química é complementar à ionização de elétrons (Hoffmann & Stroobant, 2007).

O processo de ionização por ESI ocorre quando um solvente volátil contendo os analitos é bombeado através de um fino capilar de aço inoxidável. Uma alta tensão é aplicada à ponta deste capilar, e como consequência deste forte campo elétrico, a amostra que sai pelo capilar estará dispersa em um aerossol

composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas (Yamashita & Fenn, 1984).

Um analisador de massas de setor utiliza um campo elétrico estático, ou um setor magnético (ou ainda a combinação dos dois) para afetar a trajetória e a velocidade íons até sua chegada ao detector (Souza, 2008). Os íons são submetidos a uma trajetória circular, e íons com maiores valores de  $m/z$  percorrem uma trajetória maior enquanto que íons de menor valor de  $m/z$  percorrem uma trajetória menor, e assim são separados. Como exemplos de analisadores de massa, temos: setor eletrostático (E ou ESA), energia cinética; setor magnético (B), impulso; quadrupolo (Q), estabilizar ou desestabilizar seletivamente os íons, de acordo com seus valores de  $m/z$ ; armadilha de íons (IT-*Ion Trap*),  $m/z$ , frequência de ressonância; tempo de voo (TOF – *Time of flight*).

#### MARCADORES PROTEICOS NO SÊMEN CAPRINO E DE OUTRAS ESPÉCIES ANIMAIS

O sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides (gametas masculinos) e secreção dos órgãos acessórios do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal (Hafez & Hafez, 2002).

O plasma seminal (PS) dos mamíferos é uma secreção fisiológica oriunda de várias glândulas do trato reprodutor masculino (secreções dos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias), que desempenha importante papel na maturação final dos espermatozoides através de acontecimentos hormonais, enzimáticos e de modificação de superfície, e funciona como meio para veiculação dos espermatozoides ejaculados (Mann, 1978). Esta mistura complexa difere entre as espécies (Mortarino et al. 1998; Villemure et al. 2003; Strzezek et al. 2005), bem como entre os machos da mesma espécie, variação individual [revisado por (Strzezek et al. 2005).], e contém uma variedade de componentes bioquímicos (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

O fato de o plasma seminal desempenhar importante papel na maturação dos espermatozoides faz dele material biológico de uso comum nos muitos trabalhos de proteômica, visando determinar perfil proteico, ou seja, caracterizar e identificar proteínas como, por exemplo: as proteínas de ligação ao espermatozoide (*Binder sperm proteins* - BSPs), metaloproteinases de matriz (MMPs); proteínas com

afinidade à heparina (HAPs); espermedesinas; fosfolipase A2 e lactoferrina.

Jobim et al. (2005) ao avaliar o perfil proteico do plasma seminal de ovinos por eletroforese bidimensional encontrou proteínas, spots 3 (18–19 kDa, pI 4.8–5.0) e 5 (17–18 kDa, pI 5.0–5.2), que avaliadas por Western Blot mostraram ser semelhantes as proteínas de ligação ao espermatozoide (*Binder sperm proteins* - BSP) A1/A2, identificadas nos estudos de Manjunath & Sairam (1987). O seu papel na fertilização, especificamente na capacitação espermática, é conferido pela sua ligação ao grupo colina de fosfolípidios presente na membrana de espermatozoides (Desnoyers & Manjunath, 1992), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e glicosaminoglicanos como a heparina (GAG) presentes fluido folicular e tubário (Thérien et al., 1995; 1997; 2001). Ao investigar por imunocitoquímica e microscopia confocal a distribuição topográfica da ligação de proteínas seminais à membrana de espermatozoides bovinos epididimários e ejaculados, Souza et al. (2011) concluiu que PGDS, BSP-A3 e NUC2 interagem diretamente com espermatozoides bovinos, e mostrou distribuição topográfica específica; a BSP-A3 ligou-se a todas as regiões estudadas, de forma mais intensa na peça intermediária e acrossoma. Estes achados permitem melhor compreensão sobre o papel desempenhado por essas proteínas na regulação da função espermática e da fertilidade.

As metaloproteinasas de matriz (MMP), proteases dependentes de zinco, formam o maior grupo de enzimas que digerem os componentes da matriz extracelular (ECM) (Nagase & Woessner, 1999). Os resultados encontrados por Saengsoi et al. (2011), ao detectar no plasma seminal de cães as formas latente e ativa das MMP-9 e MMP-2 através da zimografia em géis com substrato gelatina, sugeriram que uma maior ativação da pro-MMP-9 e MMP-9 pode ser obtida a partir do processo de espermatogênese anormal; e a presença da MMP-2 pode beneficiar a viabilidade e motilidade dos espermatozoides. Fowlkes & Winkler (2002) mostraram que as MMPs podem estar envolvidas na ativação de outras citocinas e fatores de crescimento, pois em condições fisiológicas ou mesmo patológicas, a atividade das MMPs é transitória ou cronicamente aumentada, e é possível que um número incontável de citocinas e fatores de crescimento possam ser liberados simultaneamente ou em períodos que se sobrepõem.

Dentre as proteínas do plasma seminal, destacam-se as com afinidade a heparina (HAP), que possuem

ação na capacitação espermática e reação acrossômica (Killian et al., 1993). As HAPs no plasma seminal de reprodutores caprinos foram estudadas por La Falci et al. (2002), através da separação por cromatografia líquida e caracterização por SDS-PAGE. Eles investigaram as mudanças sazonais das proteínas do plasma seminal e observaram que o padrão das HAPs tinha relação com a estação do ano, que elas deterioraram a motilidade espermática e o acrossoma e eram 4,4 vezes mais concentradas durante a estação de não cobrição. Chandonnet et al. (1990), através de estudos cromatográficos de fluido seminal bovino, mostraram que as proteínas do plasma seminal de bovinos, BSP-BSP-A1, A2, A3 e BSP-BSP-30-kDa, se ligam à heparina. Os seus resultados sugerem que as proteínas do plasma seminal bovino estão envolvidas na capacitação dos espermatozoides, interagindo com os glicosaminoglicanos e/ou lipoproteínas de alta densidade encontradas no trato reprodutivo da fêmea.

As espermedesinas pertencem à família das lectinas, sendo glicoproteínas de baixo peso molecular (12-16 kDa) compostas por 109 e 133 aminoácidos e constituídas estruturalmente por um único domínio CUB, que serve como suporte estrutural e ao qual se pode atribuir diferentes funcionalidades (ROMERO et al., 1997). Até o momento, as espermedesinas foram identificadas no plasma seminal suíno (AWN, AQN-1, AQN-3, Calvete et al., 1996; PSPI/PSP-II, Varela et al., 1997), bovino (SPADH-1 e SPADH-2, Einspanier et al., 1991; aSFP, Wempe et al., 1992; Z13, Tedeschi et al., 2000), equino (HSP-7, Reinert et al., 1996), ovino (Espermedesina de 15,5 kDa, Bergeron et al., 2005) e caprinos (BSFP, Teixeira et al., 2002; Melo et al., 2008).

A fosfolipase A2 pertencem a uma superfamília de enzimas que realizam a clivagem de fosfolípidios da membrana celular em ácidos graxos e lisofosfolípidios, numa reação dependente de cálcio; originalmente descrita por Roy (1957) é secretada pela glândula bulbouretral de reprodutores caprinos e ovinos. As fosfolipases A2 (PLA2) catalisam especificamente as hidrólises das ligações ácido-éster na posição sn-2 de glicerofosfolípidios liberando, como produto da catálise, ácidos graxos e lisofosfolípidios (Van Deenen & De Haas, 1963). Sias et al. (2005), isolou e sequenciou o cDNA da BUSgp60 e confirmou que a mesma pertence realmente à família das lipases pancreáticas, mais especificamente à subfamília das proteínas 2 relacionadas às lipases pancreáticas (PLRP2 – *pancreatic-lipase-related protein 2*), com grande similaridade com a PLRP2 de humanos e cavalos. Dessa forma, foi proposto o nome de GoPLRP2,

para essa proteína específica nos caprinos, em vez de BUSgp60 (antigo nome, o qual referia apenas as proteínas encontradas na secreção da glândula bulbouretral)(Pellicer-Rubio et al., 1997).

A lactoferrina (anteriormente conhecida como lactotransferrin) é uma glicoproteína (massa molar em torno de 80 kDa) da família das transferrina, a qual pertence às proteínas capazes de se ligar e transferir os íons  $Fe^{3+}$  (Aisen & Leibman, 1972; Metz-luxo et al., 1984). Essa proteína possui várias funções biológicas, incluindo papéis no metabolismo do ferro, a proliferação e diferenciação celular e atividade antimicrobiana, antiviral e antiparasitária (Adlerova et al., 2008). Explicam Hinto et al. (1995), que estas proteínas estão associadas com a proteção contra o estresse oxidativo, que é uma fonte potencial de danos aos espermatozoides. Chacur et al. (2006) investigaram a presença e incidência de bandas proteicas específicas do plasma seminal em

touros Nelore aptos e parcialmente aptos para a atividade reprodutiva e, dentre os resultados, a eletroforese revelou a existência de uma proteína de 80KDa, provavelmente a lactoferrina, presente em 16,6% dos touros aptos; e em 83,3% dos animais parcialmente aptos para a reprodução. Esta proteína também foi identificada no plasma seminal de carneiros (ARAÚJO, 2000), possuindo efeitos benéficos sobre a motilidade espermática, percentual de espermatozoides móveis e frequência de batimento flagelar in vitro em carneiros; e equinos (Inagaki et al., 2002).

Este é apenas um pequeno exemplo de proteínas do sêmen dentro do grande universo que a proteômica abrange. Outros exemplos de estudos experimentais e revisões sobre a proteômica aplicada à busca de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva nas espécies animais são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Estudos experimentais e revisões sobre a proteômica aplicada à busca de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva nas espécies animais.

TRABALHOS	OBJETIVOS	AUTORES	ANO
<b>Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals (Review)</b>	Atualização de estudos com proteínas em espermatozoides e fluidos seminais, sobretudo em animais domésticos.	MATOUFEK, J.	1985
<b>Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins in Principal Cells, Spermatozoa, and Fluid Associated with the Rat Epididymis</b>	Analisar, por eletroforese, as proteínas citosólicas aquosas solúveis em populações específicas de células somáticas localizadas na cauda e corpo do epidídimo de ratos.	SHABANOWITZ & KILLIAN	1987
<b>Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars</b>	Esclarecer a relação entre os níveis da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) e qualidade do sêmen em cachaços.	HUANG et al.	2000
<b>Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa</b>	Determinar a presença da HSP70 nos espermatozoides bovinos e sua localização subcelular durante as diferentes fases da espermatogênese.	KAMARUDDIN et al.	2004
<b>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma a proteins and their relation with semen freezability</b>	Avaliar o baixo peso (10-30 kDa) do perfil proteico do plasma seminal bovino por eletroforese bidimensional (2DE) e determinar se algumas destas proteínas tem relação com a congelação do sêmen.	JOBIM et al.	2004
<b>Function of complement regulator y proteins in immunity of reproduction: a review</b>	Apresentar os mecanismos específicos da atividade regulatória do complemento e proteínas, bem como a sua função nos processos de fertilização e expressão em tecidos e órgãos humanos e animais.	VALENTOVIČOVÁ et al.	2005
<b>Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction</b>	Abranger uma seleção de avanços no campo da proteômica funcional de proteínas do plasma seminal de javali e estar focado em algumas tecnologias proteômicas fundamentais.	STRZEZEK et al.	2005

<b>Effect of Cryopreservation on Sea Bass Sperm Proteins</b>	Utilizar a 2DE associada à espectrometria de massa por analisador de tempo de voo e ionização/dessorção da matriz assistida por laser (MALDI) para verificar se o processo de criopreservação, aplicado ao sêmen de robalo, afetou a expressão das proteínas envolvidas no controle das funções espermáticas.	ZILLI et al.	2005
<b>Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</b>	Avaliar as mudanças mensais do perfil proteico do plasma seminal ovino usando eletroforese em gel de poliácridamida bidimensional (2DE) com um gel de poliácridamida de gradiente linear.	CARDOZO et al.	2006
<b>1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats</b>	Mapear a distribuição de proteínas do plasma seminal ao longo do ano em caprinos do Nordeste do Brasil, por meio de eletroforese 1D e correlacionar possíveis variações de proteínas totais com fatores ambientais.	TEIXEIRA et al.	2009
<b>Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nelore bulls</b>	Identificar as proteínas de ligação à heparina (HBPS) no plasma seminal de touros Nelore ( <i>Bos taurus indicus</i> ).	FERNANDES et al.	2009
<b>Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes</b>	Comparar o detergente extraído de proteínas do sêmen de touros com diferentes índices de fertilidade, a fim de destacar os marcadores putativos do sêmen.	D'AMOURS et al.	2010
<b>Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams</b>	Estabelecer a identidade da composição das principais proteínas dos fluidos do trato reprodutivo de carneiros adultos da raça Santa Inês.	SOUZA et al.	2012

## CONCLUSÕES

A utilização de técnicas de análise proteômica, como a eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massa, aplicadas à identificação de proteínas relacionadas com a capacidade reprodutiva do rebanho caprino, contribui com o crescimento e desenvolvimento da reprodução e melhoramento do potencial zootécnico dentro do rebanho. Estas proteínas cuja expressão está relacionada com processos fisiológicos, como, por exemplo, os processos relacionados à capacidade fecundante dos espermatozoides, permitem classificá-las como potencial biomarcador reprodutivo. A obtenção de resultados como estes, considerando a grande relevância econômica que a espécie caprina representa para o Nordeste brasileiro, auxilia no crescimento e desenvolvimento do setor reprodutivo e conseqüentemente, da caprinocultura, pois esses métodos associados às técnicas usuais (exame andrológico, análise bioquímicas etc.) permitirão um maior entendimento e identificação de diferenças do potencial de fertilidade dos animais.

As pesquisas voltadas para o campo da proteômica, aplicadas à avaliação reprodutiva dos rebanhos são

escassas se comparadas com a taxa de crescimento do setor e exigências de mercado para a caprinocultura. Espera-se que essa necessidade sirva de estímulo para maiores investimentos para a pesquisa científica e com isso, contribua de forma positiva para o desenvolvimento do setor.

## REFERÊNCIAS

- Aisen, P. & Leibman, A. 1972. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Structure*, 257(2), 314-323.
- Alaoui-Jamali, M.A. & Xu, Y.J. 2006. Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *J. Zhejiang Univ. SCI. B*. 7(6): 411-420.
- Adlerova, L., Bartoskova, A. & Faldyna, M. 2008. Lactoferrin: a review. *Vet Med-Czech*. 53(9), 457-468.
- Anderson, N.G., & Anderson, N.L. 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: Past, present and future. *Electrophoresis*. 17(3): 443-453.
- Araújo, A.A. 2000. Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle. Tours. *L'Université François - Rabelais de Tours*. These de Doctorat. 200p.
- Baltimore, D. 2001. "Our genome unveiled." *Nature*. 409(6822): 814-816.

- Berkelman T. & Stenstedt, T. 2002. 2-D Electrophoresis using Immobilized pH Gradients: Principles & Methods. 2<sup>o</sup> edition. Uppsala, Sweden, *Amersham Biosciences*. 220p.
- Bleakney, W. 1930. The ionization of hydrogen by single electron impact. *Phys. Rev.* 35(10): 1180.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1): 248-254.
- Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C. & Manjunath, P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 71(4): 461-470.
- Budzikiewicz, H. & Grigsby, R.D. 2006. Mass spectrometry and isotopes: a century of research and discussion. *Mass Spec. Reviews.* 25(1): 146-157.
- Calvete, J.J., Carrera, E., Sanz, L. & Töpfer-Petersen, E. 1996. Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Biol. Chem.* 377(7-8): 521-528.
- Cardozo, J. A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T. & Cebrián-Pérez, J.A. 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology.* 66(4): 841-850.
- Chacur, M.G.M., Martinez, A.I.S. & Neto, N.B.M. 2006. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça nelore (*Bos taurus indicus*). *Vet. Not. Uberlândia*, 12(1): 87-93.
- Chandonnet, L., Roberts, K.D., Chapdelaine, A. & Manjunath, P. 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 26(4): 313-318.
- Collins, C.H., Braga, G.L. & Bonato, P.S. 2006. *Fundamentos de cromatografia*. Editora da UNICAMP, Campinas. 452p.
- D'Amours, O., Frenette, G., Fortier, M., Leclerc, P. & Sullivan, R. 2010. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction.* 139(3): 545-556.
- Dass, C. 2007. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Vol. 16. Wiley-Interscience. 577p.
- Desnoyers, L. & Manjunath, P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J. Biol. Chem.* 267(14): 10149-10155.
- de St Groth, S.F., Webster, R. G., & Datyner, A. 1963. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 377-391.
- Einspanier, R., Einspanier, A., Wempe, F. & Scheit, K.H. 1991. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179(2), 1006-1010.
- Fernandes, C.E., Souza, F.F.D., Souza-Neto, J.A. & Ribola, P.E.M. 2009. Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nelore bulls. *Ciência Rural*, 39(1): 275-278.
- Figeys, D. 2005. Proteomics: The basic overview. *Industrial proteomics: applications for biotechnology and pharmaceuticals*. Wiley, New Jersey, 1-62.
- Fowlkes, J. L. & Winkler, M. K. 2002. Exploring the interface between metallo-proteinase activity and growth factor and cytokine bioavailability. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(3): 277-287.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
- Granados L.B.C., Dias A.J.B. & Sales M.P. 2006. *Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos*. Projeto PROEX/UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. 54p.
- Hafez, E.S.E. & Hafez, B. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7<sup>o</sup> Edición. 513p.
- He, Q.Y. & Chiu, J.F. 2003. Proteomics in biomarker discovery and drug development. *J. cell. biochem.* 89(5): 868-886.
- Herbert, B. 1999. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 20(4-5): 660-663.
- Hoffmann, E. & Stroobant V. 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Third Edition. 502p.
- Huang, S.Y., Kuo, Y.H., Lee, Y.P., Tsou, H.L., Lin, E.C., Ju, C.C. & Lee, W.C. 2000. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.* 63(3): 231-240.
- Inagaki, M., Kikuchi, M., Orino, K., Ohnami, Y. & Watanabe, K. 2002. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 64(1): 75-77.
- Jelínková, P., Maňásková, P., Tichá, M. & Jonáková, V. 2003. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *Int. J. Biol.Macrom.* 32(3): 99-107.
- Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F. & Mattos, R.C. 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology.* 61(2): 255-266.
- Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Wald, V.B., Horn, A.P. & Mattos, R.C. 2005. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology.* 63(7): 2053-2062.
- Jobim, M.I.M.; Gregory, R.M. & Mattos, R.C. *Marcadores proteicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática*. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2009, Belo Horizonte. Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18. Belo Horizonte: CBRA, p. 15-23.
- Kamaruddin, M., Kroetsch, T., Basrur, P.K., Hansen, P.J. & King, W.A. 2004. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia.* 36(5): 327-334.
- Killian, G J., Chapman, D.A. & Rogowski, L.A. 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 49(6): 1202-1207.
- Klein, E., Klein, J.B. & Thongboonkerd, V. 2004. Two-dimensional gel electrophoresis: a fundamental tool for expression proteomics studies. *Contrib. Nephrol.* 141: 25-39.

- Klose, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik*. 26(3): 231-243.
- La Falci, V.S.N., Tortorella, H., Rodrigues, J.L. & Brandelli, A. 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, 57(3): 1035-1048.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. & Cox, M.M.. 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York. 1013p.
- Manjunath, P. & Sairam, M.R. 1987. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* 241(3): 685-692.
- Mann T. 1978. Experimental approach to study of semen and male reproductive function. *Int. J. Fertil.* 23: 133-137.
- Mann T. & Lutwak-Mann C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology. Springer-Verlag, Berlin. 495p.
- Martins, C.F. 2002. *Avaliação do reprodutor – exame geral e específico*. Curso de andrologia. Embrapa.
- Matos, C.A., Thomas, D.L., Nash, T.G., Waldron, D.F., & Stookey, J.M. 1992. Genetic analyses of scrotal circumference size and growth in Rambouillet lambs. *J. Anim. Sci.* 70(1): 43-50.
- Matoufek, J. 1985. Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals (review). *Anita. Play. Sci.* 8: 1-40.
- Melo, L.M., Teixeira, D.Á.A., Havt, A., da Cunha, R.M.S., Martins, D.B.G., Castelletti, C.H.M., ... & Rádis-Baptista, G. 2008. Buck (Capra hircus) genes encode new members of the spermadhesin family. *Mol. Reprod. Dev.* 75(1): 8-16.
- Metz-Boutigue, M.H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., ... & Jolles, P. 1984. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 145(3): 659-676.
- Miwa, A.C.P., Falco, P.B. & Calijuri, M.C. 2008. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. *Eng. Sanit. Amb.* 13(2): 236-242.
- Mortarino M., Tedeschi G., Negri A., Cecilian F., Gottardi L., Maffeo G. & Ronchi S. 1998. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. *Electrophoresis*. 19: 797-801.
- Nagase, H. & Woessner, J. F. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274(31): 21491-21494.
- Nier, A.O. 1947. A mass spectrometer for isotope and gas analysis. *Rev. Sci. Instrum.* 18(6): 398-411.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250(10): 4007-21.
- Pellicer-Rubio, M.T., Magallon, T. & Combarnous, Y. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57(5): 1023-1031.
- Reinert, M., Calvete, J.J., 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(3): 636-640.
- Romero, A., Romao, M. J., Varela, P.F., Kölln, I., Dias, J.M., Carvalho, A.L., ... & Calvete, J.J. 1997. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat. Struct. Biol.* 4(10): 783-788.
- Roy, A. 1957. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*. 318-319.
- Saengsoi, W., Shia, W. Y., Shyu, C. L., Wu, J.T., Warinrak, C., Lee, W.M. & Cheng, F.P. 2011. Detection of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in canine seminal plasma. *Anim. Reprod. Sci.* 127(1): 114-119.
- Santos, P. M., Teixeira, M. C., & Sá-Correa, I. 2004. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microrganismos. *Lisboa: Boletim de Biotecnologia*.
- Shabanowitz, R.B., & Killian, G.J. 1987. Two-dimensional electrophoresis of proteins in principal cells, spermatozoa, and fluid associated with the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 36(3): 753-768.
- Sias, B., Ferrato, F., Pellicer-Rubio, M.T., Forgerit, Y., Guillouet, P., Leboeuf, B. & Carrière, F. 2005. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1686(3), 169-180.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1): 76-85.
- Souza, M.V. de, Fontes, V. & Ricart, C.A.O. 1999. Análise de proteomas – o despertar da era pós-genômica. *Revista online de biotecnologia, ciência e desenvolvimento (Brasil)*. 2(7): 12-14.
- Souza, L.M. 2008. *Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular*. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFPR, Curitiba.
- Souza, C.E.A., Moura, A.A., Lima-Souza, A.C. & Killian, G.J. 2011. Binding patterns of seminal plasma proteins on bovine epididymal and ejaculated sperm membrane. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63(3): 535-543.
- Souza, C.E.A., Rego, J.P.A., Lobo, C.H., Oliveira, J.T.A., Nogueira, F.S., Domont, G.B., ... & Moura, A.A. 2012. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *J. Proteomics*. Article in press.
- Stoscheck, C.M. 1990. *Methods in Enzymology* (3 ed.), Vol. 182 (ed. by M.P. Deutscher ). Academic Press, New York. p. 50-68.
- Strzerek, J., Wysocki, P., Kordan, W., Kuklinska, M., Mogielnicka, M., Soliwoda, D. & Fraser, L. 2005. Proteomics of boar seminal plasma-current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol.* 5(3): 279-290.
- 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(20): 6175-6179.

- Teixeira, D.I.A., Cavada, B.S., Sampaio, A.H., Havt, A., Bloch, J.C., Prates, M.V., ... & 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(4): 331-335.
- Teixeira, A.V.C., Eloy, A.M.X., Furtado, J.R., Pinheiro, R.R. & Pontes, M.S. 2009. 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. *Anim. Reprod.* 6(4): 516-525.
- Thérien, I., Bleau, G. & Manjunath, P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 52(6): 1372-1379.
- Thérien, I., Soubeyrand, S. & Manjunath, P. 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57(5): 1080-1088.
- Thérien, I., Bousquet, D. & Manjunath, P. 2001. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 65(1): 41-51.
- Thomson, J.J., Aston, F.W., Soddy, F., Merton, T. R., & Lindemann, F. A. 1921. Discussion on isotopes. *Proc. Roy. Soc. London. Series A.* 99(697): 87-104
- Valentovičová, J., Simon, M. & Antalíková, J. 2005. Function of complement regulatory proteins in immunity of reproduction: a review. *Czech J. An. Sci.* 50: 135-141.
- Van Deenen, L.L.M. & De Haas, G.H. 1963. The substrate specificity of phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects.* 70: 538-553.
- Varela, P.F., Romero, A., Sanz, L., Romão, M.J., Topfer-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(4): 635-649.
- Villemure, M., Lazure, C., & Manjunath, P. 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1(39): 1477-7827.
- Vispo, N.S. 2004. *Combinatoria Molecular*. Elfos Scientiae. La Habana 10600, Cuba. 405p.
- Yamashita, M. & Fenn, J.B. 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88: 4451-4459.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M. R., ... & Humphery-Smith, I. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16(1): 1090-1094.
- 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(1): 232-237.
- Westemeier, R. & Naven, T. *Proteomics in practice*. 3 ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2002.
- Wilson, K. & Walker, J.M. 1995. *Principles and techniques of practical biochemistry*. 4th New York, 586p.
- Wittmann-Lieboldet, B., Graack, H.R. & Pohl, T. 2006. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*. 6(17): 4688-4703.
- Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.V. & Lichtig, J. 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim. Nova.* 21(6): 787-793.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Rossano, R., Storelli, C. & Vilella, S. 2005. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biol. Reprod.* 72(5): 1262-1267.