

através da caracterização de proteínas específicas envolvidas na atividade espermática; e recentemente, em transgênese animal, onde estas proteínas vêm sendo estudadas na captação de DNA exógeno através de técnicas de transferência gênica em massa, como SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer) (Collares, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi detectar, isolar e caracterizar parcialmente uma espermedesina presente no plasma seminal de galos através da técnica de cromatografia de troca iônica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizados 14 galos adultos saudáveis, submetidos a mesma alimentação e alojados em gaiolas individuais no Biotério Central da UFPel. A coleta de sêmen foi realizada através de massagem abdominal. O sêmen colhido foi centrifugado a 800 *g* por 10 min, e o *pellet* de espermatozoides foi descartado. O sobrenadante (plasma seminal) foi estocado a -20°C para ser usado posteriormente.

Um *pool* do plasma seminal foi dializado contra água destilada, para em seguida ser congelado. As proteínas liofilizadas (20 mg) foram dissolvidas em tampão fosfato 0,02M (pH 7,0) e colocados em coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel, 1,2 x 20 cm), a qual foi previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após remoção do material não retido a coluna foi eluída com um gradiente de NaCl (0-1M).

As proteínas dializadas-liofilizadas obtidas no pico da DEAE-Sephacel foram aplicadas a uma coluna Hitrap Heparin Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta precisão de fase reversa (HPLC). As proteínas foram eluídas usando força iônica com gradiente de NaCl (0-1M). As frações foram colhidas a um fluxo de 1mL/min e monitoradas a 280 nm. As proteínas eluídas foram analisadas posteriormente por eletroforese.

O Gel de Eletroforese de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) foi realizado a 15% de gel de poliacrilamida de acordo com Laemmli (1970).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O plasma seminal após ter sido passado em uma coluna cromatográfica de troca-iônica DEAE-SEPHACEL apresentou uma fração maior retida de 0,124 nm. Esta fração retida quando aplicada à coluna Hitrap Heparin Sephacel demonstrou a ausência de proteínas ligantes à heparina. Sabe-se que cada espermedesina exibe diferentes tipos de afinidade dependendo do seu estado de glicosilação e agregação (TÖPFER-PETERSEN, 1999) e que outras espermedesinas não mostram interação com heparina e glicoconjugados da zona pelúcida. Em nosso estudo, a proteína isolada do plasma de galos através da cromatografia DEAE Sephacel não mostrou capacidade de se ligar à heparina, como observado na figura 3.

A análise do perfil eletroforético da fração retida mostrou uma banda com 66kDa e nas frações coletadas na cromatografia de afinidade não foram detectadas bandas protéicas na eletroforese como esperado, uma vez que não foram observados picos durante o processo cromatográfico.

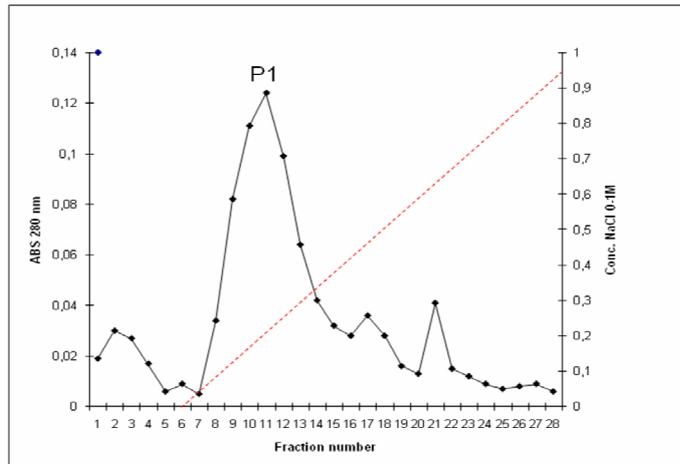


Figura 1: Cromatografia do plasma seminal em coluna DEAE-Sepharcel demonstrando as proteínas retidas.

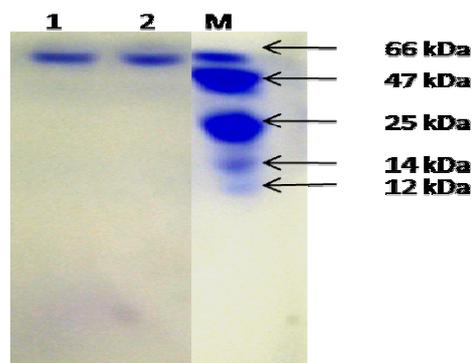


Figura 2: Análise em eletroforese em Gel de poliacrilamida mostrando a banda com 66 kDa – SDS: 1. Pico Galo Retido Reduzido; 2. Pico Galo Retido Não - reduzido.

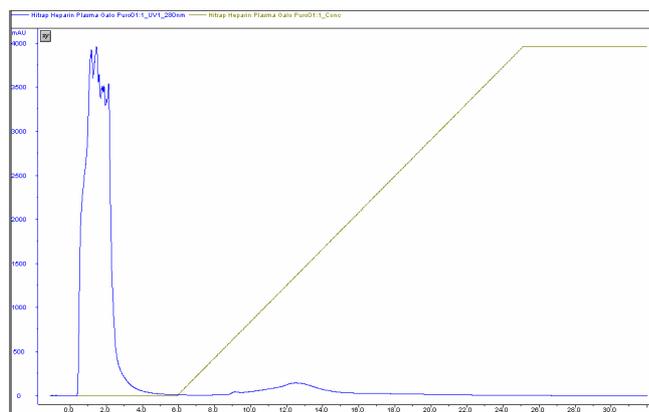


Figura 3: Grafico da cromatografia de afinidade à heparina demonstrando a ausência de proteínas ligantes à heparina no pico obtido na DEAE-Sepharcel.

4. CONCLUSÕES

Foi isolada uma banda proteica com 66 kDa que não possui afinidade à heparina. A próxima etapa do trabalho será a caracterização por espectrometria de massa e seqüenciamento dos aminoácidos para estudo da função da molécula purificada. Também serão realizados experimentos com a utilização da proteína em testes de fertilização *in vitro* e *in vivo* para avaliação da influência na fertilidade de machos reprodutores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALVETE J.J.; SOLÍS D.; SANZ, L.; DIAZ-MAURINO, T.; TÖPFER-PETERSEN, E. Glycosilated boar spermadhesin AWN-1 isoforms: biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites and effect of glycosylation on ligand binding. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, p. 667-673, 1994.
- COLLARES T., BONGALHARDO D.C., DESCHAMPS J.C., MOREIRA H.L.M. Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction **Anim Reprod.**, 2:11-27, 2005.
- JONÁKOVÁ, V., KRAUS, L., CÉCHOVÁ, K., BEZOUSKA, M., TICHÁ, J. **Reprod. Fertil.** 114 (1998) 25.
- JELÍNKOVÁ, P., MANÁSKOVÁ, P., TICHÁ, M., JONÁKOVÁ, V. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2003, v. 32, p. 99-107.
- SANZ, L., CALVETE, J.J., MANN, K., GABIUS, H.J., TOPFER-PETERSEN, E. **Molecular Reproduction**. Dev. 35 (1993) 37.
- STRZEZEK, J., SAIZ-CIDONCHA, F., WYSOCKI, P., TYSZKIEWICZ, A., JASTRZEBSKI, M. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports**, 2002, v. 20, p. 255-266.
- STRZEZEK, J., WYSOCKI, P., KORDAN, W., KUKLINSKA, M., MOGIELNICKA, M., SOLIWODA, D., FRAZER, L. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproduction Biology**, 2005, v. 5, p. 279-290.