

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ROSIVALDO QUIRINO BEZERRA JÚNIOR

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO SÊMEN DE REPRODUTORES
CAPRINOS SOROPOSITIVOS PARA A ARTRITE ENCEFALITE
CAPRINA**

**FORTALEZA
2015**

ROSIVALDO QUIRINO BEZERRA JÚNIOR

ANÁLISE PROTEÔMICA DO SÊMEN DE REPRODUTORES CAPRINOS
SOROPOSITIVOS PARA A ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira.

FORTALEZA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Bezerra Júnior, Rosivaldo Quirino.

Análise proteômica do sêmen de reprodutores caprinos soropositivos para a artrite encefalite caprina [recurso eletrônico] / Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior. - 2015.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 108 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2015.

Área de concentração: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientação: Prof.^a Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

Coorientação: Prof.^a Dra. Ângela Maria Xavier Eloy.

1. CAEV. 2. Sangue. 3. Sêmen. 4. Zimografia. 5. Eletroforese Bidimensional. I. Título.

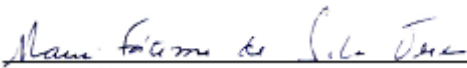
ROSIVALDO QUIRINO BEZERRA JÚNIOR


ANÁLISE PROTEÔMICA DO SÊMEN DE REPRODUTORES CAPRINOS
SOROPOSITIVOS PARA A ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA


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


Aprovada em: 20/07/2015


BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora


Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria Xavier Eloy
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária - EMBRAPA
Co-orientadora


Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária - EMBRAPA
Examinador


Prof.^a. Dr.^a. Maria Gorete Flores Salles
Universidade da Integração Internacional
da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB
Examinadora


Prof.^a. Dr.^a. Edmara Chaves Costa
Universidade da Integração Internacional
da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB
Examinadora

Dedico a minha família, em especial aos meus pais, Rosivaldo Quirino e Antonieta Guilherme, que sempre me apoiaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), da Faculdade de Veterinária (FAVET), da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo apoio financeiro.

Ao Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza, em especial, aos doutores Frederico Bruno Moreno, Marina Duarte Pinto Lobo, Ana Cristina O. Monteiro-Moreira e Renato de Azevedo Moreira.

A Prof^ª. Dr^ª. Maria Fátima da Silva Teixeira pelos ensinamentos, apoio e discernimento desde o projeto inicial no mestrado aos passos finais da tese; e pelo exemplo como pessoa, sempre a cuidar de tudo e todos.

A Prof^ª. Dr^ª. Ângela Maria Xavier Eloy, pesquisadora da EMBRAPA, por abrir as portas do seu laboratório, orientar e mostrar o quão vasto é o mundo da Proteômica.

Ao Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro, pesquisador da EMBRAPA, por seu apoio, ensinamentos, e estar sempre disposto a ajudar, direcionar na busca por soluções e formação de novos caminhos.

A Dr^ª. Lúcia Sider, pelo apoio, amizade, conselhos e por compartilhar sua poesia.

A João Ricardo Furtado, Físico, técnico da EMBRAPA, por me ensinar e ajudar a desenvolver o meu projeto, sempre paciente diante das muitas dúvidas e questionamentos; pela amizade e exemplo.

A José Nobrega Medeiros, técnico da EMBRAPA, pela amizade, apoio nas coletas e rotina laboratorial.

A Elizângela Pereira, cuja amizade, apoio nas coletas, rotina laboratorial, pelo projeto em comum, foi essencial para conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Virologia, em especial, Gabrielle e Rebeca, pelo apoio, conhecimento, amizade e companheirismo.

A minha namorada, Fernanda Nathiara, pelo amor, paciência, amizade e compreensão diante das minhas mudanças de cidade, ausências, angústias e dificuldades nesse longo e árduo caminho.

Aos meus pais, Rosivaldo Quirino Bezerra e Antonieta Guilherme dos Ramos Bezerra, que mesmo diante das dificuldades, batalharam para criar seus seis filhos com amor, educação, discernimento, preparando-os para a vida.

Aos meus irmãos, pela amizade, companheirismo e por relevarem a minha ausência nos muitos momentos em família.

Aos demais que contribuíram de alguma forma e, não foram citados, meu sincero agradecimento.

A Deus, por ter me dado força, discernimento, paciência e perseverança ao trilhar e continuar na pesquisa, ensinando-me que o conhecimento é infinito diante das muitas dúvidas, questionamentos, frente a cada resposta encontrada.

RESUMO

A maioria das pesquisas para diagnóstico e avaliação da lentivirose se baseia na identificação, direta ou indireta, da proteína viral no sangue, leite, sêmen, saliva ou tecidos. Trabalhos com proteômica avaliando as lentivirose são escassos. A princípio, a análise, detecção e/ou avaliação do vírus são realizadas a partir, principalmente, de amostras de sangue, sendo a maioria dos estudos realizados relacionada ao HIV. O perfil proteico do plasma seminal de pequenos ruminantes associado com índices reprodutivos já foi determinado, mas trabalhos correlacionando a presença dessas proteínas no sêmen à Artrite Encefalite Caprina (CAE) são escassos. Na primeira fase desse trabalho foi avaliada a atividade das metaloproteinases (MMPs) no sangue por meio da zimografia (eletroforese unidimensional) e, na segunda fase, o trabalho objetivou analisar o perfil proteico do plasma seminal de caprinos soropositivos cronicamente para a CAE e identificar proteínas presentes no plasma seminal relacionadas com a enfermidade que possam ser utilizadas no futuro como possíveis marcadores da doença. Para tanto, foi realizada a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e espectrometria de massa de amostras de plasma seminal de reprodutores soropositivos crônicos para a CAE. A zimografia mostrou alta atividade das MMPs (MMP-2 e MMP-9) no grupo soropositivo. A avaliação seminal mostrou não haver diferença estatística para os parâmetros volume, motilidade e vigor (respectivamente, $0,97^A \pm 0,61$; $82,78^A \pm 7,52$; $3,89^A \pm 0,58$) entre grupos; porém existente para a concentração espermática ($4,22^B \pm 0,71$). A análise bidimensional dos géis mostrou grande número de *spots* em ambos os grupos avaliados, porém com maior número nos animais soropositivos. A cronicidade da CAE em reprodutores caprinos pode ter sido a responsável pela maior expressão e atividade das proteínas no sangue (MMP-2 e pro-MMP-2) e plasma seminal. A espectrometria de massa permitiu identificar no plasma seminal proteínas de resposta imune, relacionadas, possivelmente, ao quadro crônico da doença.

Palavras-chave: CAEV. Sangue. Sêmen. Zimografia. Eletroforese Bidimensional.

ABSTRACT

The most research for diagnosis and evaluation of lentiviruses are based on the identification (direct or indirect) of the viral protein in the blood, milk, semen, saliva or tissues. Works with proteomics evaluating lentiviruses are scarce. At first, virus's analysis, detection and assessment are made from mainly blood samples, most of the studies related to HIV. Studies have conducted the protein profile of seminal plasma of small ruminants associating with reproductive parameters but works correlating the presence of these proteins in the semen with Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) are scarce. The first phase of this work aimed to evaluate the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) in the blood by zymography (1D-PAGE). In the second phase, the study aimed to analyze the protein profile of seropositive CAE goats and to identify proteins related with the disease that may be used as markers in the future. Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry was used on samples of seropositive goat bucks chronically infected with CAE. The zymography showed high activity of MMPs (MMP-2 and MMP-9) in the seropositive group. Semen evaluation showed no difference with volume, motility and vigor parameters (respectively, $0.97^A \pm 0.61$; $82.78^A \pm 7.52$; $3.89^A \pm 0.58$); however, there was significant difference of sperm concentration between groups ($4.22^B \pm 0.71$). The two-dimensional analysis revealed a great number of spots in both groups, however there was a higher number in seropositive animals. CAE chronicity in bucks may have been responsible for greater expression and activity of proteins in seminal plasma. Mass spectrometry allowed the identification of immune response proteins in seminal plasma, possibly related to the chronic state of the disease.

Keywords: CAEV. Blood. Semen. Zymography. Two-dimensional electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 – Análise de expressão de proteínas do sêmen por eletroforese bidimensional..... 54

CAPÍTULO 2

- Figura 1 – Zimograma representativo das amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos dos grupos, soropositivo (A) e soronegativo (B) para CAE..... 71
- Figura 2 – Quantificação das formas latente e ativa da MMP2 de amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos soropositivos (n = 5) e soronegativos (n = 5) para CAE..... 72
- Figura 3 – Densitometria dos zimogramas mostrando a diferença da atividade das MMPs entre os reprodutores soropositivos (A) e soronegativos (B) para CAE. Bandas evidenciadas (setas)..... 73

CAPÍTULO 3

- Figure 1 – Two-dimensional profile of plasma seminal proteins of bucks. A-E represent the control group gels and F-J are seropositive group gels..... 97
- Figure 2 – Dispersion of gel 2D-PAGE duplicates considering the percentage volume (% Vol) of spots..... 98
- Figure 3 – 3D view spots/transparent mode. Seronegative (black) and seropositive (gray) CAE animals..... 99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1 – Estudos experimentais e revisões sobre a proteômica aplicada à busca de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva nas espécies animais..... 57
- Quadro 1 – Principais métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas totais..... 55

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 – Classificação do índice articular clínico (IAC) dos grupos soropositivo e soronegativo para CAE de reprodutores caprinos da Região Semiárida do Brasil..... 74

CAPÍTULO 3

- Table 1 – Analysis of seminal parameters between CAE seronegative and seropositive goats..... 91
- Table 2 – Average number of spots and matches in two-dimensional gels of CAE seronegative (A-E) and seropositive (F-J) bucks..... 92
- Table 3 – Similar proteins found in the seminal plasma of seronegative and seropositive CAE buck identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (ESI-Q-ToF). Table includes spots detected in 18-cm gels, obtained within the 4-7 pH interval..... 93
- Table 4 – Proteins of the seminal plasma of buck naturally infected with CAE identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (ESI-Q-ToF). Table includes differential spots detected in 18-cm gels, obtained within the 4-7 pH interval..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEV - Vírus da anemia infecciosa equina

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

AQN - Proteína de ligação a carboidratos

aSFP - Proteína ácida do fluído seminal

AWN - Proteína do plasma seminal de varrão

BCA - Ácido Bicinconínico

BSFP - Proteína do fluído seminal de caprino

BSP - Proteínas do plasma seminal bovino

°C - Grau Celsius

CAE - Artrite encefalite caprina

CAEV - Vírus da artrite encefalite caprina

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBB - *Coomassie Brilliant Blue*

CEUA - Comissão de Ética para o Uso de Animais da UECE

CFSPH - Center for Food Security and Public Health

CI - Ionização química

Cm - Centímetro

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Cu²⁺ - Cobre

2DE - Eletroforese bidimensional

E - Eletrostático

ECM - Componentes da matriz extracelular

EI - Ionização de elétrons

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

EM - Espectrometria de massa

EMBRAPA - Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

ESI - Ionização por eletrospray

FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

Fe³⁺ - Ferro

FC - Frequência cardíaca

FIV - Vírus da imunodeficiência felina

FR - Frequência respiratória

G - Força gravitacional

GPX - Glutathione peroxidase

HAPs - Proteínas com afinidade à heparina

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HSP - Proteínas de choque térmico/proteína do plasma seminal de cavalo

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IAA - Iodoacetato

IAC - Índice articular clínico

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IDGA - Imunodifusão em gel de agarose

IEF - Focalização isoeletrica

IPG - Gradiente de pH imobilizado

IT - Armadilha de íons

kDa - Quilodalton

kW - Quilowatt

LVPR - Lentivirus de pequenos ruminantes

M - Molar

µg - Micrograma

Mab - Anticorpos monoclonais

MALDI - Ionização e dessorção da matriz assistida por laser

Min - Minuto

Mg - Miligramas

mL - Mililitro

mm² - Milímetros quadrados

mM - Milimolar

MMPs - Metaloproteinases de matriz

Mr - Massa molecular relativa

MVV - Maedi Visna Vírus

m/z - Massa/Carga

nm - Nanômetro

MW - *Mass Weight*

OIE - Organização Internacional de Epizootias – Organização mundial de saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

PLA2 - Fosfolipase A2

PLRP2 - *Pancreatic-lipase-related protein 2*

pI - Ponto isoelétrico

Q - Quadrupolo

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RBS - Sítio de ligação do receptor

RIFI - Reação de Imunofluorescência indireta

SDS-PAGE - Eletroforese unidimensional (dodecil sulfato de sódio)

SIV - Vírus da imunodeficiência símia

T - Temperatura

Th-2 - T helper-2

TOF - Time of flight

UECE - Universidade Estadual do Ceará

UNIFOR - Universidade de Fortaleza

UV - Ultravioleta

USA - *United States of America*

WB - *Western Blotting*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 LENTIVIROSES DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR).....	18
2.2 PROTEOMA X PROTEÔMICA	19
2.3 PROTEÔMICA NO SÊMEN APLICADA AO ESTUDO DAS LENTIVIROSES DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR)	20
3 JUSTIFICATIVA	24
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	25
5 OBJETIVOS	26
5.1. OBJETIVO GERAL.....	26
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
6 CAPÍTULO 1	27
7 CAPÍTULO 2	59
8 CAPÍTULO 3	75
9 CONCLUSÕES	100
10 PERSPECTIVAS	101
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de um rebanho com alto padrão zootécnico depende em grande parte do plantel de reprodutores. A escolha do plantel, a princípio, é realizada por meio da utilização de exame andrológico e avaliação dos parâmetros seminais, porém há a necessidade de métodos complementares, como a análise proteômica, que permitam uma melhor correlação desses parâmetros com índices de fertilidade.

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 importante papel 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.

Na avaliação dos reprodutores, o manejo sanitário é outro ponto crucial para desenvolvimento e produção destes. Dentre as enfermidades de pequenos ruminantes, a Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença infectocontagiosa de sintomatologia geralmente crônica, cujo vírus pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus* (ICTV, 2014). Essa enfermidade apresenta, na região nordeste do Brasil, alta prevalência nos rebanhos leiteiros (MELO, FRANKE, 1997; PINHEIRO et al., 2001; PINHEIRO et al., 2004).

Estudos têm determinado o perfil proteico no plasma seminal de pequenos ruminantes associando com índices reprodutivos (SOUZA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2009; MOURA et al., 2010), mas trabalhos correlacionando a presença dessas proteínas no sêmen à CAE são escassos, considerando a inexpressiva produção sobre o assunto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LENTIVIROSES DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR)

O gênero *Lentivirus* alberga os vírus da Imunodeficiência Viral Bovina (BIV), Humana (HIV-1, HIV-2), Felina (FIV), Símia (SIV), Anemia Infecciosa Equina (AIEV) e o Lentivírus Puma; e em caprinos e ovinos, respectivamente, os vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e Maedi Visna (MVV), compondo as lentiviroses de pequenos ruminantes (LVPR) (ICTV, 2014).

Os LVPR se assemelham quanto à genética, mecanismos moleculares de replicação, morfologia e interações biológicas entre os seus hospedeiros (CALLADO et al., 2001); tratam-se de vírus não oncogênico que causa enfermidade de progressão lenta após longo período de infecção subclínica (GENDELMAN et al., 1985).

Os lentivírus são partículas esféricas, envelopadas com aproximadamente 100 nm de diâmetro com núcleo cônico e denso, no qual estão inseridas moléculas idênticas de RNA fita simples, uma molécula de transcriptase reversa dependente de Mg^{2+} e proteínas do nucleocapsídeo (GONDA et al., 1986). O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias e de superfície. Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz que está situada entre o capsídeo e o envelope (PEPIN et al., 1998).

O CAEV, exemplar deste grupo, trata-se de um RNA vírus, não oncogênico, que ocasiona artrite, paralisia e pneumonia, meses a anos pós-infecção inicial em caprinos (NARAYAN et al., 1985). A encefalomielite, apesar de pouco comum, é observada em cabritos com 2-4 meses de idade (CORK et al., 1974; GUEDES et al., 2013).

A infecção ocorre devido transferência de fluídos contendo macrófagos infectados com o vírus de animais doentes para os sadios (PUGH, 2005). A principal via de transmissão é a ingestão de colostro ou leite de cabra infectada pelas crias ao nascer, porém outros fluídos podem atuar na veiculação do vírus, como as secreções urogenitais, saliva, fezes e secreções respiratórias (ADAMS et al., 1983).

A predileção do vírus pelo sistema monocítico-fagocitário permite que este esteja presente de forma latente (monócitos) e ativa (macrófagos) no organismo, sendo um fator importante no diagnóstico da doença. Muitas são as formas de diagnóstico da enfermidade, porém, na confirmação a doença, a combinação da anamnese, avaliação dos sinais clínicos,

sorologia e, quando necessário, a realização de exame histológico de tecidos, é suficiente para ter um diagnóstico presuntivo (CFSPH, 2007; OIE 2008; LING et al., 2013).

O diagnóstico da CAE é realizado através de técnicas imunológicas, indiretas, e técnicas de detecção do vírus ou isolamento, diretas (FRANKE, 1998). A princípio, o sangue é utilizado como material biológico usual na identificação da doença, mas a busca e necessidade por um diagnóstico mais acurado, em especial para o HIV, conferiram maiores investimentos na área no que diz respeito à realização de novas metodologias.

Os ensaios mais comumente utilizados para diagnosticar sorologicamente a presença de infecção do lentivírus em ruminantes são a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). O IDGA é utilizado na pesquisa de anticorpos, sendo o teste de triagem nos rebanhos recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), por não ser um teste laborioso e de alto custo, com boa reprodução e alta especificidade (OIE, 2008). Outros métodos são utilizados para o diagnóstico da CAE, por exemplo: o Isolamento Viral, Reação em cadeia da polimerase (PCR), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Hibridização in situ (HIS), Radioimunoprecipitação (RIPA) e Western Blotting (WB).

A análise proteômica, método direto para identificar, quantificar e estudar as modificações pós traducionais das proteínas, associada à espectrometria de massas, é outra ferramenta em potencial que pode ser aplicada na avaliação e diagnóstico do CAEV.

2.2 PROTEOMA X PROTEÔMICA

Proteoma, segundo Wasinger et al. (1995), consiste no conjunto de proteínas expressas por um organismo em um dado momento, compreendendo 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; havendo forte e sinérgica correlação entre os estudos proteômicos e genômicos uma vez que investigam a organização celular ao nível complementar, proteínas e genes, fornecendo informações que aumentam sua eficiência (SOUZA et al., 1999).

Diversos estudos sobre proteoma se baseiam 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-LIEBOLD et al., 2006).

Segundo Vispo (2004), a análise proteômica inclui diversos campos de pesquisa voltados à identificação de proteínas expressas por um organismo numa determinada condição, proteômica descritivas ou estruturais; identificação de alterações no nível de expressão da proteína associada com alterações nas condições dos organismos, proteômica comparativa; avaliação funcional, interação proteína-proteína, proteômica funcionais; e identificação de proteínas que formam uma organela.

A espectrometria de massa (EM) é uma técnica que permite avaliar a massa molecular, quantificar e identificar compostos desconhecidos, revelando a estrutura de moléculas e determinando 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 trípticos, informação estrutural, sequenciamento de peptídeos, identifica modificações pós-traducionais (SANTOS 2008).

2.3 PROTEÔMICA NO SÊMEN APLICADA AO ESTUDO DAS LENTIVIROSES DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR)

Proteômica na reprodução de ruminantes

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

Nos mamíferos, o plasma seminal é oriundo das glândulas do trato reprodutor do macho (secreções dos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias), desempenhando importante papel na maturação final dos espermatozoides através de processos hormonais, enzimáticos e de modificação de superfície, funcionando também como meio para veiculação dos espermatozoides ejaculados (MANN, 1978). O importante papel deste na maturação dos espermatozoides o torna material biológico de uso comum nos trabalhos de proteômica, voltados principalmente para a avaliação reprodutiva (MATOUSEK, 1985; SHABANOWITZ; KILLIAN, 1987; KAMARUDDIN et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2009).

Dentre as proteínas do plasma seminal, destacam-se as proteínas 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 não sexual. Chandonnet et al. (1990), através de estudos cromatográficos de fluido seminal bovino, mostraram que as proteínas do plasma seminal de bovinos, BSP-A1, A2, A3 e BSP-30-kDa, se ligam à heparina.

As espermedesinas são um grupo de proteínas de baixo peso molecular (12-14 kDa) encontradas no plasma seminal e associadas a superfície dos espermatozoides, constituindo uma maior fração de pequenas proteínas de ligação à heparina (HSP), tendo sido descritas até o momento em ungulados (REINERT et al., 1996; TÖPFER-PETERSEN et al., 1998; TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Estas são enzimas multifuncionais que possuem capacidade e afinidade de ligação a matriz de oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados (TÖPFER-PETERSEN et al., 1998).

As bodesinas pertencem ao grupo das espermedesinas. Em reprodutores caprinos foi isolada e parcialmente caracterizada uma proteína do fluido seminal com homologia as espermedesinas (TEIXEIRA et al., 2002); sendo posteriormente caracterizada (TEIXEIRA et al., 2006). Em outro trabalho, foi caracterizado o gene BSFP (*Buck Seminal Fluid Protein*) e investigada a sua expressão ao longo do trato genital masculino (MELO et al., 2008). Em carneiros da raça Santa Inês, foi reportada abundância das bodesinas como componente seminal (SOUZA et al., 2012).

A PDC-109, também denominada por BSP-A1/-A2, está entre as três principais proteínas do plasma seminal bovino (BSPs), uma família de proteínas de ligação à heparina; sendo estas pequenas proteínas ácidas, com pesos moleculares aparentes de 15-16 kDa, PDC-109 e BSP-A3 (GWATHMEY et al., 2006). No plasma seminal de caprinos, foi caracterizado um grupo de proteínas relacionadas estruturalmente às BSPs encontradas em touro, varrão e garanhão (VILLEMURE et al., 2003).

O plasma seminal e espermatozoides dos mamíferos contêm altos níveis de arilsulfatase, enzima responsável pela desulfatação dos glicoconjugados (GADELLA et al., 1991). A arilsulfatase A foi reportada em touros como sendo um componente do fluido da

cauda do epidídimo (MOURA et al., 2010); e, em carneiros da raça Santa Inês, mostrou interagir com o espermatozoide durante o trânsito epididimário (SOUZA et al., 2012).

A clusterina é uma chaperona extracelular que previne a agregação de proteínas não nativas. Foi reportada no fluido seminal de carneiros, onde mostrou sinais de agrupamento com células de Sertoli de rato e eritrócitos (FRITZ et al., 1983). Em touros de alta fertilidade foi encontrada em abundância no fluido das glândulas acessórias (MOURA et al., 2006).

Este é apenas um pequeno exemplo de proteínas do plasma seminal dentro do grande universo que a proteômica abrange.

Proteômica nas lentiviroses

A maioria das pesquisas para diagnóstico e avaliação da lentivirose se baseiam na identificação, direta ou indireta, de proteínas virais no sangue, leite, sêmen, saliva ou tecidos. Trabalhos com proteômica avaliando as lentiviroses são escassos. A princípio, a análise, detecção e/ou avaliação do vírus são realizadas a partir, principalmente, de amostras de sangue, sendo a maioria dos estudos relacionados ao HIV.

Proteínas salivares foram diferencialmente expressas em pacientes soropositivos, contribuindo para melhor entendimento dos efeitos da infecção por HIV-1 no proteoma da saliva humana (ZHANG et al., 2013). Em outro trabalho, foram identificadas proteínas diferencialmente expressas na mucosa cervical de mulheres resistentes ao HIV-1, com destaque para as proteínas da família das serpinas B, inibidores de proteases, e cistatina, conhecido fator anti-HIV-1 (BURGENER et al., 2008).

Um estudo realizado com pacientes soropositivos (HIV) foi comparado os níveis de glutatona peroxidase no sangue de 85 pacientes com HIV e 40 pacientes saudáveis (controle), confirmando uma redução significativa ($P < 0,05$) de glutatona peroxidase no grupo infectado (GIL et al., 2003).

Em reprodutores caprinos soropositivos crônicos para CAE, foi observada no sangue a alta atividade das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), sugerindo papel dessas proteinases no processo inflamatório crônico (BEZERRA JÚNIOR et al., 2015). As metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencem à família das endopeptidases zinco-dependentes responsável pela degradação e remodelagem dos componentes da matriz extracelular envolvidos em processos fisiológicos normais e associados a muitas enfermidades (MATRISIAN, 1990; WOESSNER, 1991).

Dias et al. (2007), ao avaliar por SDS-PAGE o sangue de reprodutores portadores do CAEV, relataram que estes apresentaram concentrações proteicas mais elevadas em comparação aos animais saudáveis. Ao analisar proteínas presentes em antígeno produzido a partir de cepa padrão (CAEV Cork) por 2D-PAGE, verificaram-se bandas proteicas que, possivelmente possam referir-se as proteínas imunogênicas do vírus (AZEVEDO et al., 2012).

Ao investigar a estrutura molecular dos epítomos da p28 e p55^{gag} no CAEV, Brandão et al. (2013) demonstraram a forte reatividade dos anticorpos monoclonais (MAbs) contra a p28 e precursores das p55^{gag}.

O CAEV foi identificado no sêmen e foi comprovada a transmissão por inseminação artificial com sêmen contaminado experimentalmente, ressaltando que apenas um ejaculado pode infectar um grande número de fêmeas (ANDRIOLI et al., 1999; ANDRIOLI et al., 2006; SOUZA et al., 2013); porém, trabalhos voltados a busca de biomarcadores no sêmen através de técnicas proteômicas visando melhor entendimento dos efeitos da infecção são escassos, havendo a necessidade de maiores estudos na área.

3 JUSTIFICATIVA

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma enfermidade infectocontagiosa multissistêmica com alta prevalência nos rebanhos leiteiros, sendo muitas as formas de diagnóstico da doença. Na triagem dos rebanhos, a associação da anamnese, avaliação dos sinais clínicos, realização de exames sorológicos e, quando necessário, a realização de exame histopatológico, é suficiente no diagnóstico presuntivo.

Em reprodutores caprinos, o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) foi identificado no sêmen, sendo comprovada a transmissão por inseminação artificial com sêmen contaminado experimentalmente, ressaltando que apenas um ejaculado pode infectar um grande número de fêmeas (ANDRIOLI et al., 1999; ANDRIOLI et al., 2006; SOUZA et al., 2013).

A alta incidência nos rebanhos e a necessidade por novas metodologias diagnósticas para a CAE diante da soroconversão tardia tornam a análise proteômica uma ferramenta em potencial na busca por biomarcadores da doença.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Animais infectados naturalmente para a CAE com sintomatologia clínica crônica apresentam atividade elevada das metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9, formas latente e ativa) no sangue e proteínas no plasma seminal relacionada à infecção, atuando como possíveis biomarcadores da enfermidade.

5 OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis biomarcadores para diagnóstico da CAE em amostras de sangue e plasma seminal de reprodutores caprinos soropositivos crônicos.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a triagem dos animais para CAE por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e Western Blotting (WB);
2. Detectar as metaloproteinases de matriz (MMPs) em amostras de sangue de animais soropositivos crônicos para a CAE através da zimografia;
3. Detectar as proteínas do plasma seminal de reprodutores soropositivos crônicos para CAE através da eletroforese bidimensional (2DE);
4. Analisar, determinar e identificar as proteínas dos géis bidimensionais do plasma seminal por espectrometria de massa (ESI-Q-TOF-MS) e pesquisar possíveis biomarcadores proteicos ligados à infecção pela CAE.

6 CAPÍTULO 1

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

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.

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^{1*}, Gabrielle Roseblit Martins¹, Igor Ciríaco Barroso¹, Rebeca Cavalcante Marinho¹, Tereza D'Ávila de Freitas Aguiar¹ e Maria Fátima da Silva Teixeira¹.

^{1*} 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. E-mail: junior_medvet2009@hotmail.com.

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 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-Liebold 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-Liebold 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 isoelétrica e da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. As proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico pela focalização isoelétrica, 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 dodecil 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 ($M_r < 10$ kDa) ou muito grande ($M_r > 150$ kDa) (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 isoelétrico** – 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 base 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) *apud* (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 aprumos. Consiste na introdução do eletroejaculador no ânus do macho, e por meio de descargas elétricas leves, promove a ejaculação (Granados et al., 2006).

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 °C. Não expor a amostra a repetidos descongelamentos.
5. Remover por ultracentrifugação todo o material precipitado. As partículas sólidas e os lipídeos devem 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 30 minutos a 4 °C. Após a separação o sobrenadante será alíquotado 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 ureia. Quando a amostra contém ureia, a temperatura não deve exceder 37 °C. Elevada temperatura faz com que a ureia 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 às suas necessidades e condições, correlacionando-se o tipo de amostra analisada.

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 isoeletricos. 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 o 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 imunocímicos (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}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 (Santos, 2008).

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); espermadesinas; 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 Blotting 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 fosfolipídios presente na membrana de espermatozoides (Desnoyers & Manjunath, 1992), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e glicosaminoglicanos como a heparina (GAG) presentes no 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 metaloproteinases 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-A1, A2, A3 e 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 - aSFP, 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 fosfolipídios da membrana celular em ácidos graxos e lisofosfolipídios, 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 glicerofosfolipídios liberando, como produto da catálise, ácidos graxos e lisofosfolipídios (Van Deenen & De Haas, 1963). Sias et al. (2005), isolaram e sequenciaram o cDNA da BUSgp60 e confirmaram 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 lactotransferrina) 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.

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^o 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*. 7ª 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.; Greigory, 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.
- Matousek, 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.Í.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., Ceciliani 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. & Combarous, 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.

Santo, L.D. 2008. Palestra: "Estratégias e aplicações da Espectrometria de massas". In: Workshop em Métodos de estudo da estrutura e função de proteínas e peptídeos. Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rio de Janeiro - RJ. 2008.

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.

Strzezek, 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

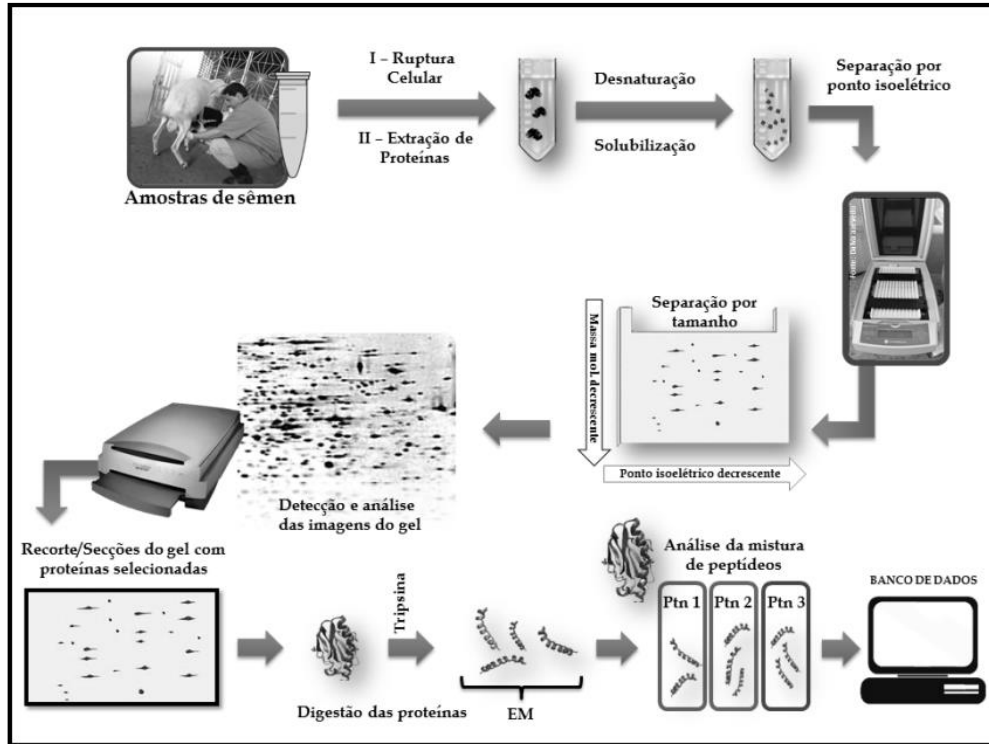


Figura 1. Análise de expressão de proteínas do sêmen por eletroforese bidimensional. Fonte: arquivo pessoal (adaptado de Vispo, 2004)

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 1×10^{-3} mg.L ⁻¹ (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 1×10^{-5} mg.L ⁻¹ (Wilson & Walker, 1995).
3. <i>Coomassie Brilliant Blue</i> BG-250 (Reagente de Bradford)	Interação entre o corante <i>Coomassie Brilliant Blue</i> (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 2×10^{-5} mg.L ⁻¹ (Wilson & Walker, 1995).
4. BCA (Ácido Bicinconínico)	Formação de complexo colorido com BCA, pela redução do Cu ⁺² , em meio alcalino, com proteínas (Zaias et al., 1998).	Leitura a 562 nm (Smith et al., 1985) e limite de detecção de 5×10^{-7} mg.L ⁻¹ (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° devido a diversos aminoácidos	-

	(fenilalanina, cisteina, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina) e, a segunda devido à ligação peptídica (Stoscheck, 1990) in (Zaias et al., 1998).	
--	---	--

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
Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals (Review)	Atualização de estudos com proteínas em espermatozoides e fluidos seminais, sobretudo em animais domésticos.	MATOUSEK, J.	1985
Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins in Principal Cells, Spermatozoa, and Fluid Associated with the Rat Epididymis	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
Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars	Esclarecer a relação entre os níveis da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) e qualidade do sêmen em cachorros.	HUANG et al.	2000
Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa	Determinar a presença da HSP70 nos espermatozoides bovinos e sua localização subcelular durante as diferentes fases da espermatogênese.	KAMARUDDIN et al.	2004
Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability	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
Function of complement regulator y proteins in immunity of reproduction: a review	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
Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their	Abranger uma seleção de avanços no campo da proteômica funcional de proteínas do plasma seminal de varrão e estar focado	STRZEZEK et al.	2005

application in biotechnology of animal reproduction	em algumas tecnologias proteômicas fundamentais.		
Effect of Cryopreservation on Sea Bass Sperm Proteins	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 espermiáticas.	ZILLI et al.	2005
Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis	Avaliar as mudanças mensais do perfil proteico do plasma seminal ovino usando eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2DE) com um gel de poliacrilamida de gradiente linear.	CARDOZO et al.	2006
1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats	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
Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nelore bulls	Identificar as proteínas de ligação à heparina (HBPS) no plasma seminal de touros Nelore (<i>Bos taurus indicus</i>).	FERNANDES et al.	2009
Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes	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
Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams	Estabelecer a identidade da composição das principais proteínas dos fluidos do trato reprodutivo de carneiros adultos da raça Santa Inês.	SOUZA et al.	2012

7 CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ NO SANGUE DE REPRODUTORES CAPRINOS NATURALMENTE INFECTADOS COM ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA NA REGIÃO SEMIÁRIDA DO BRASIL

EVALUATION OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN BLOOD FROM BUCK
NATURALLY INFECTED WITH CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS IN SEMIARID
REGION OF BRAZIL

RESUMO

Estudos têm tentado compreender a importância das MMPs na patogenia de enfermidades causadas por lentivírus, sendo o vírus da imunodeficiência humana (HIV) o mais investigado. Apesar dos avanços nos estudos com as MMPs em outras doenças, pesquisas correlacionando a atividade das gelatinases em animais infectados pela CAE são incipientes havendo a necessidade de maiores estudos visando compreender a dinâmica destas enzimas em animais infectados e sua relação com a condição patológica. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e atividade das MMPs (MMP-2 e MMP-9) no soro sanguíneo de reprodutores cronicamente infectados pela CAE. O experimento foi constituído de dois grupos, sendo cinco animais por grupo, pertencentes ao rebanho experimental da Embrapa. O primeiro foi composto de animais das raças Saanen (n = 2) e Anglo-Nubiano (n = 3), com idade variando entre 4-5 anos, naturalmente infectados com o CAEV. O segundo grupo consistiu também de animais das raças Saanen (n = 2) e Anglo-Nubiano (n = 3), com idade entre 3-4 anos, soronegativos para a CAE. A comprovação da presença e ausência do vírus foi realizada através do *Western Blotting* (WB) e confirmada pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), ao longo dos dois primeiros anos. Amostras de sangue dos animais foram coletadas por venopunção da jugular e avaliadas através da zimografia (SDS-PAGE) usando a gelatina como substrato. Os animais foram submetidos a exame clínico, no qual foram avaliadas a temperatura (T), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e índice articular clínico (IAC). O índice articular foi calculado pela medição da circunferência das articulações carpianas e ossos metacarpianos e calculada a diferença entre a maior medida do carpo e a menor do metacarpo. Nos grupos experimental e controle, encontraram-se as massas moleculares de 66 (MMP-2), 72 (pro-MMP-2), 86 (MMP-9) e 92 kDa (pro-MMP-9). Foi observada uma correlação negativa entre as MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) e a FR ($r = -0.1285$) e T ($r = -0.2588$); e, positiva para FC ($r = 0.01038$), porém não significativas ($P < 0.05$). A correlação do IAC ($r = -0.7393$) com as MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) foi negativa. A análise densitométrica dos géis mostrou maior atividade da pró-MMP-2 e MMP-2 no grupo soropositivo. O presente estudo mostrou que a elevada atividade das MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) em reprodutores infectados cronicamente pela CAE sugere a presença de processo inflamatório em animais com e sem sintomatologia articular, possibilitando utilizar a atividade das MMPs como biomarcadores no monitoramento da infecção.

Acta Scientiae Veterinariae

RESEARCH ARTICLE

Avaliação das Metaloproteinases de Matriz no Sangue de Reprodutores Naturalmente Infectados com Artrite Encefalite Caprina na Região Semiárida do Brasil

Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior¹, Ângela Maria Xavier Eloy³, Elizângela Pinheiro Pereira², João Ricardo Furtado³, Kelma Costa de Souza¹, Adriano Rodrigues Lima³, Raymundo Rizaldo Pinheiro³, Alice Andrioli³ & Maria Fátima da Silva Teixeira¹.

¹Laboratório de Virologia (LABOVIR). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil. ²Departamento de Ciência Animal, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral, CE, Brasil. ³Empresa de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Caprinos e Ovinos), Estrada Sobral/Groaíras, Sobral, CE, Brasil. CORRESPONDENCE: R.Q. Bezerra Júnior [junior_medvet2009@hotmail.com - Fax: +55 (85) 3101-9849]. LABOVIR, Faculdade de Veterinária, UECE, Avenida Dr. Silas Munguba, n. 1700, Campus do Itaperi CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brasil.

ABSTRACT

Background: Studies have attempted to understand the importance of metalloproteinase (MMPs) in the pathogenesis of diseases caused by lentiviruses, being the human immunodeficiency virus (HIV) the most investigated. Despite advances in studies with MMPs in others diseases, research correlating the presence and activity of gelatinases in animals affected by caprine arthritis encephalitis virus (CAEV), lentiviruses, are incipient and there is a need for research aiming to understand the dynamic of these enzymes in animals infected and its relation to pathological condition. The aim of this study was to evaluate the presence and activity of the MMPs in blood serum of chronically infected bucks by CAEV.

Materials, Methods & Results: The experiment was constituted by two groups (n = 5 each group). The first one was composed of five naturally infected bucks (4-5 years) and second group constituted of five seronegative bucks (3-4 years) for CAE. Serology was performed using the Western Blotting (WB) and confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR). These bucks belong to the experimental flock at EMBRAPA Goats and Sheep and the seropositive

bucks were confirmed for CAE in the first two years. Blood samples were collected by puncturing the jugular vein from animals and evaluated by zymography (SDS-PAGE) using gelatin as substratum. Clinical examination was performed by evaluating the temperature (T), cardiac frequency (FC), respiratory frequency (FR) and clinical articular index (IAC). The IAC was calculated by measuring the circumference of carpal joint and metacarpal bone height (difference between greater extent carpal and metacarpal lesser extent). In infected and control groups were found molecular mass bands of 66 kDa (MMP-2), 72 kDa (pro-MMP-2), 86 kDa (MMP-9) and 92 kDa (pro-MMP-9). The correlation analysis between respiratory frequency (RF), cardiac frequency (CF) and temperature (T°C), with MMPs activity (pro-MMP-2 and MMP-2), showed a negative and not significant correlation for RF ($r = -0.1285$) and T ($r = -0.2588$) and positive for CF ($r = 0.01038$), but not significant. Using the gel densitometry analysis it was observed higher activity ($P < 0.05$) of the pro-MMP-2 and MMP-2 in seropositive group.

Discussion: The caprine arthritis encephalitis (CAE) is a multisystem infectious disease that causes production losses when present in flocks, especially the occurrence of arthritis. The higher activity of the MMPs (MMP-2 and MMP-9) in infected group to CAE suggests a role of these proteases in the chronic inflammatory process in goats. It can be explained by the fact that matrix metalloproteinases are regarded to be the key role molecules in inflammation and are involved in pathophysiological remodeling of the vascular wall. The variable presence of active and latent forms of MMP-9 in our study combined to an increased in the seropositive group activity corroborates the findings of other studies. In this study, only one seropositive animal demonstrated apparent arthritis although showed similar MMPs (MMP-2 and MMP-9) activity to others in the seropositive group, leads us to suggest that all the seropositive animals were stricken with an inflammatory process. Although there was statistical difference between the groups regarding to MMPs activity, this was not reflected on clinical symptoms in chronically infected animals, requiring further studies on this subject.

Keywords: CAEV, zymography, metalloproteinase, MMP-2, MMP-9.

INTRODUÇÃO

As metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencem à família das endopeptidases zinco-dependentes responsável pela degradação e remodelagem dos componentes da matriz extracelular envolvidos em processos fisiológicos normais e associados a muitas enfermidades [21, 27]. Foram identificadas pelo menos 24 MMPs em mamíferos, podendo ser agrupadas em cinco classes: colagenases, gelatinases, estromelinas, metaloproteinases tipo membrana (MT-MMPs) e outras enzimas. As gelatinases estão presentes nas formas latente e ativa (MMP2 e MMP-9), sendo capazes de degradar colágeno, gelatina, agregano, laminina, fibronectina, elastina e componentes secundários da matriz extracelular (ME) [24].

O processo inflamatório crônico e consequente ativação das MMPs têm efeito deletério no organismo, sendo observado em patologias crônicas e degenerativas, cujos sintomas são comumente observados em doenças causadas por vírus pertencentes ao gênero *Lentivirus*. Este gênero, além do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e Maedi Visna vírus (MVV), contém o vírus da imunodeficiência viral bovina (BIV), humana (HIV-1, HIV-2), felina (FIV) e símia (SIV), como também o vírus da anemia infecciosa equina (AIEV) e o lentivirus puma [13].

Estudos têm tentado compreender a importância das MMPs na patogenia de enfermidades causadas por lentivírus, sendo o HIV o mais investigado. Porém, apesar dos avanços nos estudos com as MMPs em outras doenças, pesquisas correlacionando a atividade das gelatinases em animais infectados pela CAE são incipientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e atividade das MMPs (MMP-2 e MMP-9) no soro sanguíneo de reprodutores cronicamente infectados pela CAE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização

O experimento foi conduzido entre os meses de junho e outubro (2013) nas instalações da EMBRAPA Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral (3°45'0,5" Sul, 40°20'45,8" Oeste, 111 m altitude), CE, Brasil. A região semiárida é caracterizada por um clima quente e seco, com precipitação média anual de 713 mm e temperatura média de 27-35°C.

Animais

O trabalho foi constituído de dois grupos, sendo cinco animais por grupo, pertencentes ao rebanho experimental da Embrapa. O primeiro foi composto de animais das raças Saanen (n = 2) e Anglo-Nubiano (n = 3), com idade variando entre 4-5 anos, naturalmente infectados com o CAEV. O segundo grupo consistiu também de animais das raças Saanen (n = 2) e Anglo-Nubiano (n = 3), com idade entre 3-4 anos, soronegativos para a CAE. A comprovação da presença e ausência do vírus foi realizada através do *Western Blotting* (WB) [23] e confirmada pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) [1], ao longo dos dois primeiros anos. Os grupos experimentais foram alojados em baias, e mantidos em sistema semi-intensivo em uma área isolada por cercas duplas, recebendo concentrado balanceado, capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), sal mineral e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos a exame clínico, no qual foram avaliadas a temperatura (T), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e índice articular clínico (IAC). O índice articular foi calculado pela medição da circunferência das articulações carpianas e ossos metacarpianos e calculada a diferença entre a maior medida do carpo e a menor do metacarpo (Tabela 1) [22]. Para avaliação do IAC foi usado como padrão os seguintes valores: para machos caprinos puros com idade acima de 3.1 anos é considerado normal medida até 6.6 cm; suspeito entre 6.7-7.1 e com provável problema acima de 7.1 cm; para mestiços com idade de 3.1 anos é considerado normal até 6.2 cm, suspeito entre 6.3-6.8 cm e com provável problema acima de 6.8 cm) [22].

Zimografia

Para avaliação das proteínas do sangue foram realizadas quatro coletas mensais, sendo escolhida uma amostra aleatória de cada mês para a realização da zimografia. O sangue foi coletado por venopunção da jugular em tubos sem EDTA, sendo centrifugados posteriormente a 1,500 x g durante 10 min a 4°C. Depois, o sobrenadante foi transferido para microtubos Eppendorf e armazenado a -80°C.

A concentração de proteína total foi estimada usando método de Bradford [2], utilizando a albumina sérica bovina¹ (BSA) como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para realização da eletroforese 1D utilizou-se, aproximadamente, 20 µg de cada amostra em cada poço em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio 12,5% (SDS-PAGE) contendo 0,2% de gelatina porcina¹ [16, 18]. Após a eletroforese, os géis foram lavados por

40 min. em tampão de renaturação (2,5% de Triton X-100) e incubados durante a noite em tampão de desenvolvimento (50 mM Tris, pH 7,8-8,0 e NaCl 150 mM e CaCl₂ 10 mM) à 37°C em agitação constante. Sob estas condições, as gelatinases presentes nas amostras foram renaturadas e ativadas. A presença de zonas brancas de lise é uma indicação da atividade de degradação da gelatina revelada pela coloração com 0,05% de *Coomassie Brilliant Blue*² R-250² em metanol a 50% e ácido acético a 10% durante a noite. A análise densitométrica dos géis foi realizada utilizando o *gel software*³ *Analyzer*. Na corrida eletroforética foi utilizado o padrão *LMW-SDS marker kit*⁴ para calibração.

Análise estatística

A intensidade das bandas (*pixel*) mostrada no zimograma foi testada para normalidade utilizando o teste estatístico Kolmogorov-Smirnov. Depois de confirmada a normalidade dos dados, o teste t de Student foi aplicado para as amostras contendo atividade da MMP-2, adotando-se a significância estatística de $P < 0.05$. Como o pressuposto da homogeneidade da variância não foi observada para as amostras com atividade da pró-MMP-2, foi aplicada a transformação \log_{10} . O programa estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis Systems*⁵ (SAS versão 9.2).

RESULTADOS

Nos grupos experimental e controle, encontraram-se as massas moleculares de 66 (MMP-2), 72 (pro-MMP-2), 86 (MMP-9) e 92 kDa (pro-MMP-9) [Figura 1]. Em alguns animais foram encontradas proteínas de alto peso molecular (100-138 kDa), não sendo estas, no entanto, o foco deste estudo.

No grupo soropositivo a atividade da pro-MMP-2 ($P = 0.0025$) e MMP-2 ($P = 0.0001$) foi elevada significativamente ($P < 0.05$) em relação ao grupo controle (Figura 2). A pro-MMP-9 e MMP-9 foram detectadas de forma variável em algumas amostras infectadas e não infectadas (controle) e, apesar deste comportamento, mostraram uma evidente elevação da atividade no grupo soropositivo.

A atividade das MMPs no grupo soropositivo, avaliada através da análise densitométrica, foi caracterizada pelo aumento da atividade e maior número de picos em comparação ao grupo controle (Figura 3). Foi observada uma correlação negativa entre as MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) e a FR ($r = -0.1285$) e T ($r = -0.2588$); e, positiva para FC ($r =$

0.01038), porém não significativas ($P < 0.05$). A correlação do IAC ($r = -0.7393$) com as MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) foi negativa.

DISCUSSÃO

A CAE é uma doença infectocontagiosa, multissistêmica, que causa perdas na produção quando presente nos rebanhos, principalmente na ocorrência de artrite. A análise dos géis evidenciou a presença das formas latente e ativa da MMP-2 e MMP-9, em animais sadios e infectados pela CAE, mas com elevada atividade nos animais infectados. Achados similares sobre a MMP-2 foram obtidos diante da proposta que a estimulação da MMP-2 pode contribuir para um ambiente neurodegenerativo na degradação fibronectina da ME e colágeno tipo IV [19].

Em outros estudos, foi relatada uma elevação da atividade da MMP-2 e MMP-9 em amostras de cérebro de pacientes infectados com HIV ou gatos com FIV, sugerindo que estes vírus têm mecanismo comum de indução das MMPs [14,15]; e em amostras de soro de pacientes com artrite reumatoide (RA) [4]. Isto pode ser explicado pelo fato das MMPs serem consideradas moléculas com papel-chave no processo inflamatório e envolvidas na remodelação fisiopatológica da parede vascular [12, 17].

A presença das formas latente e ativa da MMP-9 neste estudo foi variável, mas com elevada atividade no grupo soropositivo, corroborando com achados de trabalhos anteriores [5, 25, 26]. Como exemplo, a atividade elevada das MMPs após a infecção pelo HIV contribui para a progressão da doença através da degradação, quebra e transposição das barreiras da matriz [20]. Por outro lado, foi descrito que a secreção de MMP-9 em macrófagos derivados de monócitos (MDM) foi acentuadamente regulada negativamente após uma infecção viral [6].

Embora não observada correlação significativa entre os parâmetros clínicos (FR, FC, T e IAC) e sinais clínicos da doença, outros autores encontraram um equilíbrio inversamente proporcional da MMP-9 e TIMP-1, sugerindo um potencial novo mecanismo de desequilíbrio do sistema imunológico pós-trauma e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) [3]. A estimulação exacerbada e crônica das MMPs resulta em um desequilíbrio entre essas enzimas proteolíticas e seus inibidores, culminando em sintomas patológicos decorrentes da degradação excessiva da ME [24].

Neste estudo, apenas um animal soropositivo apresentou artrite aparente, mas com atividade das MMPs similares aos demais do grupo, o que sugere a existência de processo inflamatório em todos os animais do grupo, evidenciado através da elevada atividade das MMPs no sangue, mas não externado clinicamente. Tentando compreender o mecanismo da MMP-9 nas doenças das articulações, foi relatado que a pro-MMP-9 é amplamente expressa e secretada por macrófagos enquanto os condrócitos não conseguem produzir esta enzima, embora a eficiência na ativação da pro-MMP-9 requeira proteinases solúveis e associadas à membrana dos condrócitos [7]. É importante mencionar que os condrócitos são células encontradas na cartilagem atuando na produção e manutenção da matriz extracelular destes.

Vale informar que o sangue é um material biológico cuja viabilidade na avaliação da presença e atividade das MMPs foi demonstrada em muitos estudos [8, 9, 10, 11].

Como este é o primeiro estudo sobre MMPs em caprinos com CAE, não foi possível uma discussão plena por falta de material bibliográfico sobre o assunto.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a elevada atividade das MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) em reprodutores infectados cronicamente pela CAE sugere a presença de processo inflamatório em animais com e sem sintomatologia articular, possibilitando utilizar a atividade das MMPs como biomarcadores no monitoramento da infecção. E a análise densitométrica dos zimogramas mostrou ser uma ferramenta complementar na avaliação clínica de caprinos infectados cronicamente a CAE.

SOURCES AND MANUFACTURERS

¹Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

²Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA.

³Copyright 2010 by Dr. Istvan Lazar.

⁴GE-Healthcare, USA.

⁵SAS versão 9.2®, Cary, NC: SAS Institute Inc.

Ethical Approval. This experiment was approved and performed under the guidelines of Ethics Committee for Animal Use of State University of Ceará (registered under number 12639611-6).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Andrioli A., Gouveia A., Pinheiro R., Rocha M., Martins A. & Santos D. 1999.** Detecção do DNA proviral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 23(3): 420-421.
- 2 **Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1): 248-254.
- 3 **Brumann M., Kusmenkov T., Ney L., Kanz K-G., Leidel B., Biberthaler P., Mutschler W. & Bogner V. 2012.** Concentration Kinetics of Serum MMP-9 and TIMP-1 after Blunt Multiple Injuries in the Early Posttraumatic Period. *Mediators of inflammation*. 2012.
- 4 **Chang Y-H., Lin I., Tsay G.J., Yang S-C., Yang T-P., Ho K-T., Hsu T-C. & Shiau M-Y. 2008.** Elevated circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinical biochemistry*. 41(12): 955-959.
- 5 **Chapel C., Camara V., Clayette P., Salvat S., Mabondzo A., Leblond V., Marce D., Lafuma C. & Dormont D. 1994.** Modulations of 92-kDa Gelatinase B and Its Inhibitors Are Associated with HIV-1 Infection in Human Macrophage Cultures. *Biochemical and biophysical research communications*. 204(3): 1272-1278.
- 6 **Ciborowski P., Enose Y., Mack A., Fladseth M. & Gendelman H.E. 2004.** Diminished matrix metalloproteinase 9 secretion in human immunodeficiency virus-infected mononuclear phagocytes: modulation of innate immunity and implications for neurological disease. *Journal of neuroimmunology*. 157(1): 11-16.
- 7 **Dreier R., Grässel S., Fuchs S., Schaumburger J. & Bruckner P. 2004.** Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Experimental cell research*. 297(2): 303-312.

- 8 **Gerlach R.F., Demacq C., Jung K. & Tanus-Santos J.E. 2007.** Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clinical biochemistry*. 40(1): 119-123.
- 9 **Gerlach R.F., Uzuelli J.A., Souza-Tarla C.D. & Tanus-Santos J.E. 2005.** Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Analytical biochemistry*. 344(1): 147-149.
- 10 **Grossetete M., Phelps J., Arko L., Yonas H. & Rosenberg G.A. 2009.** Elevation of MMP-3 and MMP-9 in CSF and Blood in Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery*. 65(4): 702.
- 11 **Gruber B.L., Sorbi D., French D.L., Marchese M.J., Nuovo G.J., Kew R.R. & Arbeit L.A. 1996.** Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clinical immunology and immunopathology*. 78(2): 161-171.
- 12 **Hu J., Van den Steen P.E., Sang Q-X.A. & Opdenakker G. 2007.** Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 6(6): 480-498.
- 13 **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) releases. 2012.** Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=27>. Acessado em 10/2013.
- 14 **Johnston J., Silva C. & Power C. 2002.** Envelope gene-mediated neurovirulence in feline immunodeficiency virus infection: induction of matrix metalloproteinases and neuronal injury. *Journal of virology*. 76(6): 2622-2633.
- 15 **Johnston J., Jiang Y., Van Marle G., Mayne M., Ni W., Holden J., McArthur J. & Power C. 2000.** Lentivirus infection in the brain induces matrix metalloproteinase expression: role of envelope diversity. *Journal of virology*. 74(16): 7211-7220.
- 16 **Kupai K., Szucs G., Cseh S., Hajdu I., Csonka C., Csont T. & Ferdinandy P. 2010.** Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 61(2): 205-209.
- 17 **Kuzuya M. & Iguchi A. 2002.** Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 10(5): 275-282.
- 18 **Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- 19 **Marshall D., Wyss-Coray T. & Abraham C. 1998.** Induction of matrix

- metalloproteinase-2 in human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 transgenic mouse brains. *Neuroscience letters*. 254(2): 97-100.
- 20 Mastroianni C.M. & Liuzzi G.M. 2007.** Matrix metalloproteinase dysregulation in HIV infection: implications for therapeutic strategies. *Trends in molecular medicine*. 13(11): 449-459.
- 21 Matrisian L.M. 1990.** Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genetics*. 6: 121-125.
- 22 Pinheiro R., Gouveia A., Alves F. & Andrioli A. 2001.** Diagnóstico de problemas articulares através da determinação do índice articular clínico em caprinos no Nordeste do Brasil. Embrapa Caprinos Comunicado Técnico, 56. 4p.
- 23 Rodrigues A.S., Brito R.L.L., Pinheiro R.R., Dias R.P., Alves S.M., Souza T.S., ... & Teixeira M.F.S. 2014.** Standardization of indirect Elisa and Western Blot for diagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(2): 417-424.
- 24 Skiles J.W., Gonnella N.C. & Jeng A.Y. 2004.** The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 11(22): 2911-2977.
- 25 Sporer B., Paul R., Koedel U., Grimm R., Wick M., Goebel F.D. & Pfister H-W. 1998.** Presence of Matrix Metalloproteinase-9 Activity in the Cerebrospinal Fluid of Human Immunodeficiency Virus—Infected Patients. *Journal of Infectious Diseases*. 178(3): 854-857.
- 26 Webster N.L. & Crowe S.M. 2006.** Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. *Journal of leukocyte biology*. 80(5): 1052-1066.
- 27 Woessner J.F. 1991.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*. 5(8): 2145-2154.

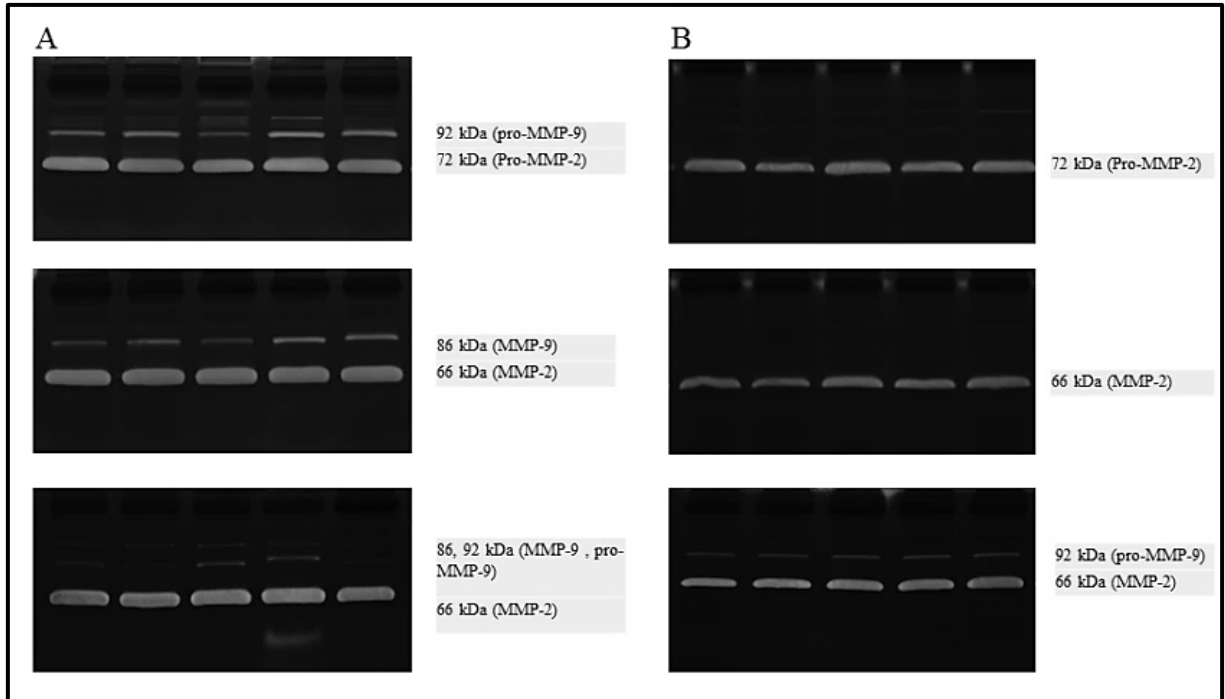


Figura 1. Zimograma representativo das amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos dos grupos, soropositivo (A) e soronegativo (B) para CAE.

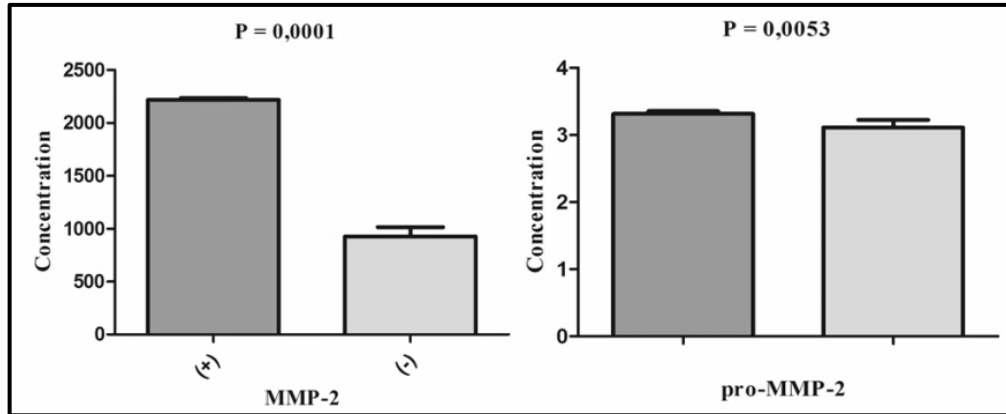


Figura 2. Quantificação das formas latente e ativa da MMP2 de amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos soropositivos (n = 5) e soronegativos (n = 5) para CAE.

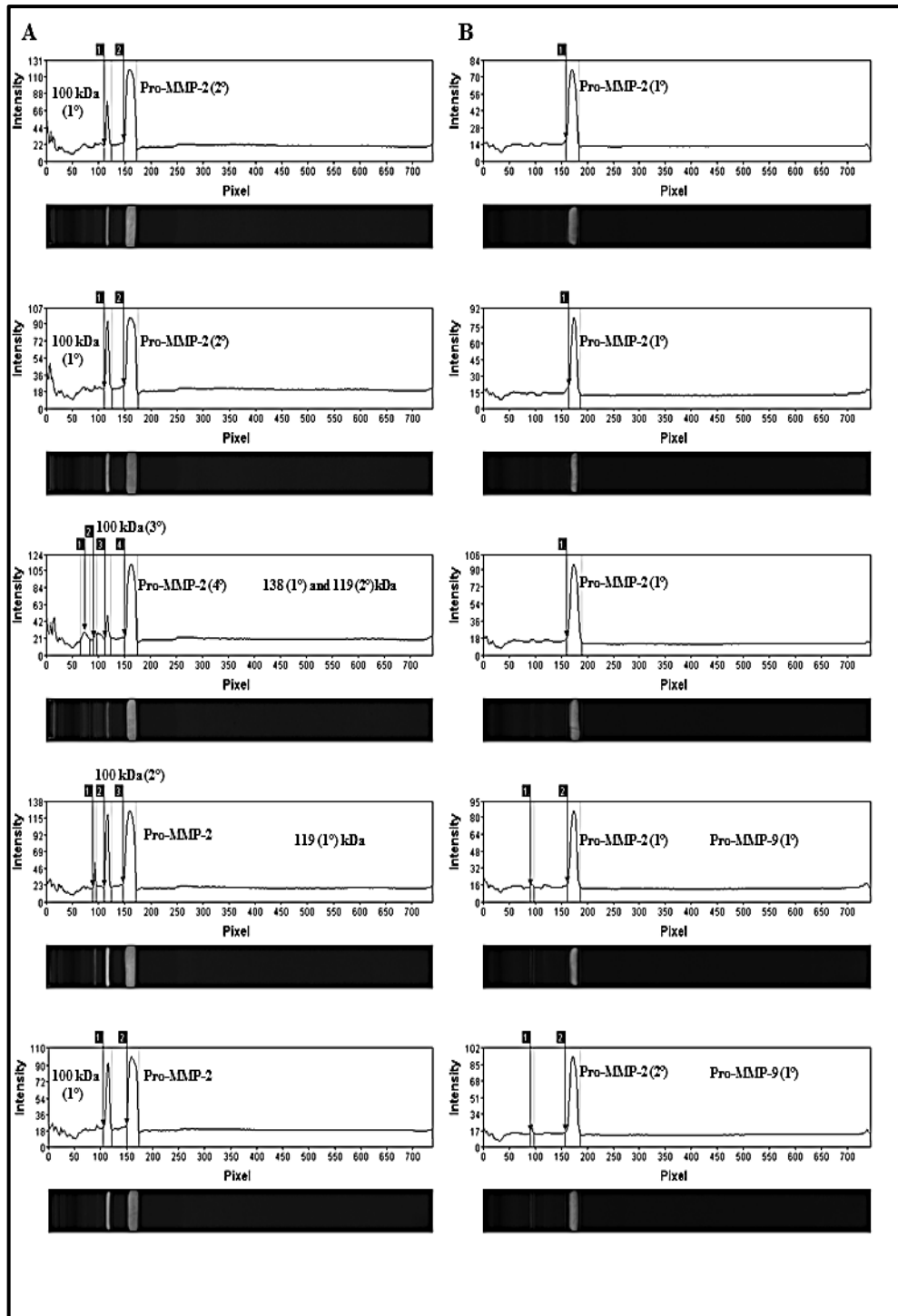


Figura 3. Densitometria dos zimogramas mostrando a diferença da atividade das MMPs entre os reprodutores soropositivos (A) e soronegativos (B) para CAE. Bandas evidenciadas (setas).

Tabela 1. Classificação do índice articular clínico (IAC) dos grupos soropositivo e soronegativo para CAE de reprodutores caprinos da Região Semiárida do Brasil.

Raça/Identificação	IAC (cm)		
	Normal	Suspeito	Provável problema articular
Puro corte/24 (+)	-	-	7,5
Puro corte /263 (+)	5,0	-	-
Puro corte /1098 (+)	4,5	-	-
Puro leite/1677 (+)	5,4	-	-
Puro leite/1690 (+)	6,0	-	-
Puro corte /974 (-)	5,5	-	-
Puro corte /1120 (-)	6,0	-	-
Puro corte /237 (-)	6,0	-	-
Puro leite/310 (-)	5,5	-	-
Puro leite/366 (-)	6,5	-	-

8 CAPÍTULO 3

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE REPRODUTORES SOROPOSITIVOS PARA A ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE)

PROTEOMIC ANALYSIS OF SEMINAL PLASMA OF SEROPOSITIVE BUCK TO
CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS (CAE)

RESUMO

O perfil proteico do plasma seminal de pequenos ruminantes associado com índices reprodutivos já foi determinado, mas trabalhos correlacionando a presença dessas proteínas no sêmen à Artrite Encefalite Caprina (CAE) são escassos. O trabalho objetivou analisar o perfil proteico do plasma seminal de caprinos soropositivos para a CAE e identificar proteínas presentes no plasma seminal relacionadas com a enfermidade que possam ser utilizadas como possíveis marcadores para a doença. Para tanto, foi realizada a eletroforese bidimensional e espectrometria de massa de amostras de plasma seminal de reprodutores soropositivos crônicos para a CAE. A avaliação seminal mostrou não haver diferença estatística para os parâmetros volume, motilidade e vigor (respectivamente, $0,97^A \pm 0,61$; $82,78^A \pm 7,52$; $3,89^A \pm 0,58$); porém, existente para a concentração espermática ($4,22^B \pm 0,71$). A análise bidimensional dos géis mostrou grande número de *spots* em ambos os grupos avaliados, porém se verificou maior número nos animais soropositivos. A cronicidade da CAE em reprodutores caprinos pode ter sido a responsável pela maior expressão e atividade das proteínas no plasma seminal. A espectrometria de massa permitiu identificar no plasma seminal proteínas de resposta imune, relacionadas, possivelmente, ao quadro crônico da doença.

Proteomic Analysis of Seminal Plasma of Seropositive Buck to Caprine Arthritis Encephalitis (CAE)

Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior^{a,*}, Ângela Maria Xavier Eloy^c, João Ricardo Furtado^c, Raymundo Rizaldo Pinheiro^c, Alice Andrioli^c, Frederico Bruno Moreno^d, Marina Duarte Pinto Lobo^d, Ana Cristina O. Monteiro-Moreira^d, Renato de Azevedo Moreira^d, Maria Fátima da Silva Teixeira^a

^aLaboratory of Virology (LABOVIR). Postgraduate Program in Veterinary Sciences (PPGCV). State University of Ceará (UECE), Fortaleza, Brazil.

^bAnimal Science Department, Acaraú Valley State University, Sobral, Brazil.

^cBrazilian Agricultural Research Corporation (Caprine and ovine EMBRAPA), Sobral, Brazil.

^dCenter of Experimental Biology (NUBEX), University of Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, Ceará, Brazil.

Corresponding author: Tel./Fax.:+55-85-31019849. E-mail address:
junior_medvet2009@hotmail.com (Bezerra Júnior, R. Q.)

Abstract

Studies have traced the protein profile of seminal plasma of small ruminants, associating with reproductive parameters, however a reduced number correlate the presence of these proteins to Caprine Arthritis Encephalitis (CAE), facing scarce or none information about this subject. Therefore, this study aimed to analyze the protein profile of seropositive CAE goats and to identify proteins related with the disease that may be used as markers. Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry was used on samples of seropositive goat bucks chronically infected with CAE. Semen evaluation showed no difference in volume, motility and vigor parameters (respectively, $0.97^A \pm 0.61$; $82.78^A \pm 7.52$; $3.89^A \pm 0.58$); however, there was significant difference of sperm concentration between groups ($4.22^B \pm 0.71$). The two-dimensional analysis revealed a great number of spots in both groups, however there was a higher number in seropositive animals. CAE chronicity in goat bucks may have been responsible for greater expression and activity of proteins in seminal plasma.

Mass spectrometry allowed for identification of immune response proteins in seminal plasma, possibly related to the chronic state of the disease.

Keywords: Seminal plasma, CAE, 2D-PAGE, Mass Spectrometry.

1. Introduction

Brazilian Northeast region contains the largest goat herd in the country, with approximately 8.6 million animals, which comprises over 90% of the national total, both for milk and meat production [1]. However, the ideal conditions in which these animals are reared are not often met, due to the fact that family production is the most common practice, strictly for subsistence. Therefore, improved feeding and sanitary management measures must be applied in production and reproduction of these animals in order to develop this type of practice.

Reproductive flock is one of the main factors responsible for breeding a high standard flock. In addition, semen parameters can be used in common routine evaluating tests to obtain such high quality herd, however complementary methods, such as proteomics, provide more precise data and help to identify markers that indicate the health status of animals concerning many diseases. One of these diseases is Caprine Arthritis Encephalitis (CAE), which presents high incidence levels in milk producing flocks in the Brazilian Northeast region.

CAE is a chronic infectious disease caused by virus from the *Lentivirus* genus, *Orthoretrovirinae* subfamily and *Retroviridae* family [2]. CAEV has been identified in the semen of reproductive goats, and experimental sexual transmission has been demonstrated with artificial contaminated semen and a single ejaculate can infect a great number of females [3–5].

Studies have evaluated the protein profile of the seminal plasma associating with reproductive data of small ruminants [6–8], however there are few studies correlating the presence of these protein to CAE in semen, since there is scarce or none information about this subject.

Therefore, this study aimed to analyze the protein profile of the seminal plasma of seropositive goats to CAE and identify the proteins that can be used as markers of the disease.

2. Materials and methods

2.1. Location and experimental animals

The experiment was performed between June and October 2013, at the Brazilian Agricultural Research Corporation (Caprine and ovine EMBRAPA), located in Sobral city, north region of Ceará State (3°45'0.5" South, 40°20'45.8" West, 111m altitude), Brazil. Semi-arid region presents hot and dry climate, with an annual average precipitation of 713mm and temperature varying from 27 to 35°C. This project was approved by the local Ethics Committee for the use of Animals of the State University of Ceará (CEUA – UECE) with the following protocol number 12639611-6.

Two groups containing five males each, two Saanen bucks and three Anglo-Nubian bucks, aging from four to five years were used in this experiment. The first group was composed by naturally CAE infected animals and the second group (Control) had negative animals. The diagnostic was performed using Western Blotting (WB) [9] confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) [3]. These animals were part of the experimental flock of goat and sheep EMBRAPA. Both groups were housed separately in pens maintained in a semi-intensive grazing system in an area isolated by a double fence. Animals were fed balanced concentrated feed, Napier grass, mineral salt and water *ad libitum*.

2.2. Semen evaluation

Collection of semen was performed twice per week using artificial vagina coupled to a graded BD Falcon™ tube (15 mL). A female goat with estrum induced by 1mL of estradiol cypionate (ECP®) administered via intramuscular injection was used weekly to stimulate goat bucks.

Semen analysis was performed immediately after collection, the volume was measured with a graded tube and concentration value ($\times 10^6$ mm³) was evaluated using spectrophotometer. Motility was determined subjectively as a percentage of total motile spermatozoids in the microscopic examination. A drop of sperm was placed in a pre-heated slide (37°C) with a cover slip. Microscopic examination was performed at X 100 magnification and followed guidelines of the Brazilian College of Animal Reproduction [10].

Every week ten ejaculates were obtained, five from each group. Collected sperm was transferred to 1.5mL microtubes, initially centrifuged at X 1,500g to separate spermatozoids and followed by a second centrifugation at X 10.000g to separate cell debris from the seminal

plasma, both with 30min each, at 4°C. Samples were then maintained at -80°C until analyses were performed.

2.3. Two-dimensional electrophoresis of the seminal plasma proteins

Two-dimensional electrophoresis was performed according to O'Farrell's method [11]. The seminal plasma from each sample was used to determine the total protein concentration [12], using Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as the standard. All assays were performed in triplicates.

Seminal plasma proteins (250µg) were solubilized in rehydration buffer (7M urea; 2M thiourea; 1% CHAPS; 0.5% IPG buffer- ampholytes – pH 4 to 7; 65mM DTT; and traces of Bromophenol blue). Solution was added to the hydration tray of the IPG Box (GE-Healthcare, USA) and incubated with immobiline strips (IPG Strips) of 13cm, pH of 4-7, for a period of 16h. Isoelectric focusing was performed with Ettan™ IPGphor™ III (GE-Healthcare, USA) using the following programming: 500 V (1000 Vh), 4000 V (5625 Vh), 10000 V (18000 Vh) and 50 V (200 Vh), with a total of 24825 Vh (10h18min). After focusing, strips were equilibrated in two steps: first, 57.8mg of DTT (1% w/v) was added to maintain the proteins denatured and reduced; then, 69.3mg of iodoacetate (IAA) (3% w/v) was added to alkylate the proteins, and every strip was homogenized for 15min in both steps.

Following equilibrium step, proteins were separated in polyacrylamide gel (SDS-PAGE 12.5%) basing on their molecular weight (MW) using SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit (GE-Healthcare, USA) with two programming (100 V, 30 mA, 100 W for 15 min and 230 V, 50 mA and 100 W for 6h) for both gels. A MW marker ranging from 14 to 97 kDa (GE-Healthcare, USA) was used. Then, gels were stained in Brilliant Blue Coomassie R-250, during 24h, after which de-staining solution (Ethanol at 30%, acetic acid at 7.5% and Milli-Q water) was used.

Two-dimensional gels were digitalized in 300dpi with Image Scanner III (GE Healthcare, USA), using software Labscan™ 6.0 (Ge-Healthcare, USA). Images were saved in tiff and then analyzed using Image Master Platinum 7.0 software (GE-Healthcare, USA). The plasma seminal maps were analyzed in match sets and each one contained 10 gels from each experimental group.

2.4. Protein identification by ESI-QUAD-TOF mass spectrometry

Target spots ($n = 75$) were de-stained and digested with trypsin [13]. The mass spectra were acquired in a Synapt G1 HDMS Acquity UPLC instrument (Waters Co., Milford, MA, USA) using a data dependent acquisition (DDA), where the three most intense peaks were subjected to MS/MS. Mobile phases A and B consisted of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile, respectively. The gradient conditions used were as follows: 0 min with 3% of B, increasing linearly to 40% B in 30 min, then it increased up to 85% B in 5 min where it remained until 40 min with column re-equilibration for 5 min. The data were processed using the Protein Lynx Global Server (Waters Co., USA) software and subjected to database search using Mascot search engine [14]. The searches were made using the NCBI nr database with the assumption that there was a maximum of one missed trypsin cleavage and peptides were monoisotopic and using partially oxidized methionine residues and completely carbamidomethylated cysteine residues.

2.5. Statistical analysis

In order to analyze seminal parameters, Shapiro-Wilk and Bartlett tests were used to verify normality and homogeneity of the data, respectively. Volume values were transformed to decimal logarithms in order to achieve normality status and concentration values were raised to the power 2. Analysis of Variance (ANOVA) was then applied in these transformed data and significance level of 5% was considered. Statistical software used in the analyses was SAS 9.2 [15].

3. Results

3.1. Seminal parameters

Seminal analysis showed no difference for volume, motility and vigor parameters among the groups, however there was significant sperm concentration difference (Table 1).

3.2. Comparative analysis by 2D-PAGE and mass spectrometry

Two-dimensional analyses of the gels showed a great number of spots (proteins) in both the analyzed group, however higher numbers were observed from CAE seropositive animals. Reference gels from each animal from both groups are shown in Fig. 1. Data obtained from the seronegative group shows a medium number of spots varying from 13.5 (Animal 1184) to 104 (Animal 978) and, in the seropositive group, the number of spots varied from 57.5 (Animal 263) to 155.5 (Animal 1677) (Table 2).

From matching spots among duplicates, their values were used to build a Scatter plots graphic, relating the spot values from both gels with a linear dependent analysis between punctual gel values (X variable) and reference gel values (Y variable). This way, the reproducibility of 2D-PAGE technique can be verified. From the generated graphics, the correlation values obtained from the similarities between the analyzed gels (Fig. 2), showed a good reproducibility in this study [16, 17].

To perform a comparative analysis between groups, the gel reference of the animal with highest average number of spots from each group, in this case, the seronegative animal C/978 (104 spots) was confronted with the seropositive animal I/1677 (155.5 spots). Therefore, resulting in a total of 40 matches and correlation of 0.858 and the highest volume (%) and number of proteins representatively of the seropositive animal was observed (Fig. 3).

The proteins of interest identified by mass spectrometry (ESI-Q-TOF) from seronegative and seropositive animals are shown in Tables 3 and 4.

4. Discussion

In this study, the presence of spots in the seminal plasma of buck goats, aiming to relate this finding with CAE disease and use them as markers is reported.

The seminal plasma is the fraction of the sperm free of cells, containing substances from testicles, epididymis, prostate, seminal vesicles, urethra and bulbourethral glands, which is a common ideal sample for studying [18].

Semen evaluation did not show difference for volume, motility and vigor, which agrees with other studies [19, 20]; however, there was difference in sperm concentration. Recently, similar alteration of the sperm concentration was observed in comparing goats with and without symptoms of arthritis [21], and CAEV influenced negatively in this aspect.

The highest number and volume of proteins in seropositive animals demonstrated by 2D-PAGE may be an indication of the chronic characteristic of this disease; which is a similar

finding to another study [22], which reported that bucks with CAE presented elevated protein concentrations in comparison to healthy animals. The use of semen for diagnostic and assessment of CAE has been performed in several studies [3, 23, 24, 5].

Analysis of the seminal plasma with mass spectrometry for similar proteins among groups showed most frequently spermadhesin Z13-like (i.e. spots 153, 237, 263, 671), bodhesin and bodhesin-2 partial (i.e. spots 708, 813, 830, 844) and seminal plasma protein PDC-109-like (i.e. spots 708, 756, 776, 790); which were more expressed in the seropositive buck.

Spermadhesins are a group of low molecular weight proteins (12-14 kDa) found in the seminal plasma and associate with the surface of spermatozoids, constituting a greater fraction of binding heparin small proteins (HSP) described until now in ungulates [25–27]. They are multifunctional proteins exhibiting ligand-binding affinities to an array of oligosaccharides and sulfated polysaccharides [26].

Bodhesins belong in the spermadhesins group. They have been isolated from goat bucks and partially characterized as a protein from the seminal fluid with homology similar to spermadhesins [28]; and were further characterized in another study [29]. The buck seminal fluid protein gene (BSFP) was characterized and the expression throughout the male genital tract was investigated in another study [30]. In addition, bodhesins were found in abundance as a semen component in Santa Inês sheep's [31].

PDC-109 (also known as BSP-A1/-A2) is one of the main three bovine seminal plasma proteins (BSPs), which is a family of heparin binding proteins that are acid and small with molecular weight of 15-16kDa (PDC-109 and BSP-A3) [32]. In plasma seminal of goats, a group of proteins with structures related to BSPs found in bulls, boars and stallions have been described [33].

In the seropositive buck, the following differential proteins have been identified: arylsulfatase A, bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing), cathepsin F isoform X1, disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2-like isoform X1, clusterin, electron transfer flavoprotein subunit beta, Immunoglobulin lambda light chain F7-299, epididymal secretory glutathione peroxidase.

Mammalian seminal plasma and spermatozoids contain high levels of arylsulfatase, enzyme that performs desulfation of glycoconjugates [34]. A component of the fluid from the tail of the epididymis of bulls [35], arylsulfatase A from Santa Inez sheep appears to interact with sperm during epididymal transit and to participate in sperm–egg binding [31].

Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) is an enzyme that catalyzes both the phosphorylation of hydroxyacetone and glyceraldehyde, as well as the separation of diphosphate-X ribonucleoside compounds; it regulates the innate immune response [36].

Cathepsins are a family of cysteine proteases found in many cell types, having testicles as their target organ, and have been described and associated with many processes inherent to spermatid maturation [37–41]. Cathepsin F, which is an important member of this family, have been found in elevated levels in brain, heart, ovary, skeletal muscle and testicles; likely important in antigen presentation by macrophages, and in a normal Th-2 response [42].

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong in the zinc-dependent endopeptidases family and are responsible for degrading and remodeling of the extracellular matrix involved in normal physiological and disease related processes [43, 44]. In chronically CAE infected seropositive goats, high activity of MMPs (MMP-2 and MMP-9) have been observed, which suggests a role of these proteinases in chronic inflammatory process [45].

Clusterin is an extracellular chaperone that prevents nonnative protein aggregation. It has been found in the seminal fluid of sheep, where signs of grouping with rat Sertoli cells and erythrocytes has been observed [46]. In bulls with high fertility, it has been found in abundance in accessory glands fluid [47].

Electron transfer flavoprotein subunit beta acts as an electron receptor specific to several dehydrogenases, transferring electrons to the main mitochondrial respiratory chain via ETF-ubiquinone oxidoreductase (ETF dehydrogenase) [48].

Immunoglobulin lambda light chain is one of the main subunits of light chain immunoglobulin (Ig), where two light and two heavy Ig chains assemble into one Ig molecule. Testing CAEV gp135 receptor binding site(s) (RBS) occlusion and structural stability by introducing mutations showed that even in high antibody concentrations, Mab F7-299 does not neutralizes the infectivity of CAEV, serving as a model to determine the base at the failure of the antibody response [49].

Glutathione peroxidase (GPX) is an enzymatic protein that acts against lipid peroxidation, therefore having an important role in protecting spermatozooids [50]. In seminal plasma, the excess of Reactive Oxygen Species (ROS) leads to oxidative stress and consequently may affect semen quality. In a study performed with seropositive (HIV) patients, the glutathione peroxidase blood levels of 85 patients with HIV/AIDS were

compared to 40 healthy patients (control), confirming a significant ($p < 0.05$) glutathione peroxidase reduction in the infected group [51].

During normal conditions, there are body locations that have no direct action of the immune system (i.e. cerebrum, anterior eye chamber and testicle). Antigens present in these sites do not suffer any effect of defense cells, characterizing the “antigenic kidnapping”. The absence of abnormalities or challenges, such as traumas, lesions or secondary conditions affecting the testicle integrity of the seropositive animal could explain the existence of so few immune response proteins. In a study with sheep lentivirus, leukocytospermia and high viral load in infected animals were important factors that determined the shedding of the virus in the semen [52].

5. Conclusions

This study is one of the first to use proteomics in viral diseases of goats. The chronic state of CAE infected bucks may have been responsible for the greater expression and activity of proteins in seminal plasma. Mass spectrometry allowed for identification of immune response proteins in the seminal plasma, possibly related to the chronic stage of the disease. Facing scarce or inexistent information on the subject, studies are necessary in order to understand the innate immune reaction and to identify possible markers that may be used in viral diagnostics.

Acknowledgments

The authors would like to thank EMBRAPA (Sobral, CE, Brazil) for allowing the use of animals and facilities. We also appreciate the support from State University of Ceará (UECE), the Brazilian Research Councils (CNPq and CAPES) and Center of Experimental Biology (NUBEX), University of Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, Brazil.

References

- [1] Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho. In: IBGE. Sidra: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro, 2010. Available at:

- <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&c=73>>. Accessed: August 2014.
- [2] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) releases. 2012. Available at: http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=27. Accessed: October 2013.
- [3] Andrioli A, Gouveia A, Pinheiro R, Rocha M, Martins A, Santos D. Detecção do DNA proviral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE): Rev Bras Reprod An 1999; 23(3):420–421.
- [4] Andrioli A, Gouveia AMG, Martins ADS, Pinheiro RR, Santos DO. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. Pesq Agropec Bras 2006; 41(8):1313–1319.
- [5] Souza KC, Pinheiro RR, Santos DO, Brito RLL, Rodrigues AS, Sider LH et al. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. Small Ruminant Res 2013; 109(2):193–198.
- [6] Souza AF, Leitão MCG, Batista AM, Porto ALF, Lima Filho JL, Guerra MMP. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. Cienc Rural 2009; 39(4).
- [7] Teixeira AVC, Eloy AMX, Furtado JR, Pinheiro RR, Pontes MS. 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. Anim Reprod 2009; 6(4):516–525.
- [8] Moura PP, Franco MM, Silva TASN, Rocha TL, Leal DR, Passos PIB et al. Characterization of seminal plasma proteins and its relationship with quality parameters of frozen semen in ram. Cienc Rural 2010; 40(5):1154–1159.
- [9] Rodrigues AS, Brito RLL, Pinheiro RR, Dias RP, Alves SM, Souza TS et al. Standardization of indirect Elisa and Western Blot for diagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis. Arq Bras Med Vet Zootec 2014; 66(2):417–424.
- [10] Colégio Brasileiro De Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2th ed. Belo Horizonte: CBRA; 1998. 49p.
- [11] O’Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975; 250(10):4007–4021.

- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(1):248–254.
- [13] Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006; 1(6):2856–2860.
- [14] Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20(18):3551–3567.
- [15] Statistical Analysis Systems - SAS Institute Inc. 2009. SAS OnlineDoc. 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- [16] Dancey CP, Reidy J. Estatística sem matemática: para psicologia usando SPSS para Windows. In *Estatística sem matemática: para psicologia usando SPSS para Windows*. Artmed; 2006.
- [17] Figueiredo Filho DB, Silva Junior JA. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). *Revista Política Hoje* 2010, 18(1).
- [18] Taylor S, Pereira AS. Antiretroviral drug concentrations in semen of HIV-1 infected men. *Sex Transm Infect* 2001; 77(1):4–11.
- [19] Rodriguez HAM, Alvarez HR, Perez JT, Setien AA, Farina GIG, Crespo JAM. Effect of the caprine arthritis encephalitis virus in the reproductive system of male goats. *Vet Mex* 2005; 36:159–176.
- [20] Paula NRO, Andrioli A, Cardoso J, Pinheiro RR., Sousa FML, Souza KC et al. Andrologic characteristics of male goats naturally infected by small ruminant lentivirus during dry and rainy seasons in Ceará. *Cienc Animal* 2009; 19(1/2):7–18.
- [21] Oliveira MLM, Ávila A, Silva PAF, Sousa S, Andrioli A. 2012. Avaliação seminal de reprodutores acometidos pelo vírus da artrite encefalite caprina. In *Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, 1., 2012, Sobral. Resumos... Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2012. p. 47-48.(Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 104).
- [22] Dias R.P, Gomes RSF, Eloy AMX, Furtado JR., Pinheiro AA, Pinheiro RR. 2007. Perfil eletroforético de proteínas do plasma seminal de caprinos em géis de diferentes concentrações de poliacrilamida. In *Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de*

- congresso (ALICE). In: SEMANA DA CAPRINOCULTURA E DA OVINOCULTURA BRASILEIRAS, 5., 2006, Campo Grande. Palestras e resumos. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; Embrapa Caprinos, 2006. Seção resumos. 4 f. 1 CD-ROM.
- [23] Al Ahmad MA, Fieni F, Pellerin JL, Guiguen F, Cherel Y, Chatagnon G et al. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology* 2008; 69(4):473–480.
- [24] Paula NRO, Andrioli A, Cardoso JFS, Pinheiro RR, Sousa FML, Souza KC et al. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Rumin Res* 2009; 85:27–33.
- [25] Reinert M, Calvete JJ, 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. *European Journal of Biochemistry* 1996; 242(3):636–640.
- [26] Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L et al. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 1998; 30(4-5):217–224.
- [27] Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci* 2005; 89(1):159–170.
- [28] Teixeira DIA, Cavada BS, Sampaio AH, Havt A, Bloch Jr C, Prates MV et al. Isolation and partial characterisation of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*), homologous to spermadhesins. *Protein Pept Lett* 2002; 9(4):331–335.
- [29] Teixeira DIA, Melo LM, Gadelha CAA, Cunha RMS, Bloch Jr C, Rádis-Baptista et al. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Genet Mol Res* 2006; 5(1):79–87.
- [30] Melo LM, Teixeira DIA, Havt A, Cunha RMS, Martins DBG, Castelletti CHM, et al. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Mol Reprod Dev* 2008; 75:8–16.
- [31] Souza CEA, Rego JPA, Lobo CH, Oliveira JTA, Nogueira FC, Domont GB et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of proteomics* 2012; 75(14):4436–4456.

- [32] Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 2006; 75(4):501–507.
- [33] Villemure M, Lazure C, Manjunath, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1(39).
- [34] Gadella BM, Colenbrander B, Lopes-Cardozo M. Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. *Biology of reproduction* 1991; 45(3):381–386.
- [35] Moura AA, Souza CEA, Stanley BA, Chapman DA, Killian GJ. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J. Proteomics* 2010; 73:2006–2020.
- [36] The Universal Protein Resource (UniProt). Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q3LXA3>. Accessed: March 2015.
- [37] Srivastava PN, Ninjoor V. Isolation of rabbit testicular cathepsin D and its role in the activation of proacrosin. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 109(1):63–69.
- [38] McDonald JK, Kadkhodayan S. Cathepsin L – a latent proteinase in guinea pig sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 151(2):827–835.
- [39] Pelouille S, Esnard A, Dacheux JL, Guillou F, Gauthier F, Esnard F. (1997). Interactions between Ovine Cathepsin L, Cystatin C and α 2-Macroglobulin—Potential Role in The Genital Tract. *Eur J Biochem* 1997, 244(1):140–146.
- [40] Burdan F, Szumiło J, Dudka J, Dąbrowski A, Maciejewski R, Wojtowicz Z. The activity and immunoexpression of cathepsin D in rat male reproductive organs. *Folia Morphol* 2006; 65(2):111–115.
- [41] Asuvapongpatana S, Saewu A, Chotwiwatthanakun C, Vanichviriyakit R, Weerachatanukul W. Localization of cathepsin D in mouse reproductive tissues and its acquisition onto sperm surface during epididymal sperm maturation. *Acta Histochem* 2013; 115(5):425–433.
- [42] Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(3):238–275.
- [43] Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6:121–125.
- [44] Woessner JF. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8):2145–2154.

- [45] Bezerra Júnior RQ, Eloy AMX, Pereira EP, Furtado JR, Souza KC, Lima AR, Pinheiro RR et al. Avaliação das metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com Artrite Encefalite Caprina na Região Semiárida do Brasil. *Acta Sci Vet* 2015; 43:1258.
- [46] Fritz IB, Burdzy K, Séthell B, Blaschuk O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod* 1983; 28(5):1173–1188.
- [47] Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl* 2006; 27: 201–211.
- [48] The Universal Protein Resource (UniProt). Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q2TBV3>. Accessed: March 2015.
- [49] Hotzel I, Cheevers WP. Mutations increasing exposure of a receptor binding site epitope in the soluble and oligomeric forms of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus envelope glycoprotein. *Virology* 339 2005; 261–272.
- [50] Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 1989; 23(1):77–90.
- [51] Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Álvarez A, Giuliani A et al. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol Res* 2003; 47(3):217–224.
- [52] De la Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ, DeMartini JC. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am J Vet Res* 1996; 57(5):684–688.

Table 1. Analysis of seminal parameters between CAE seronegative and seropositive goats.

Group	Volume	Concentration	Motility	Vigor
Negative	1.33 ^A ± 0.58	3.66 ^A ± 0.72	87.50 ^A ± 6.22	4.25 ^A ± 0.45
Positive	0.97 ^A ± 0.61	4.22 ^B ± 0.71	82.78 ^A ± 7.52	3.89 ^A ± 0.58

^{A, B}. Equal superscript capital letters in the same column indicate no statistical difference with 5% ($p > 0,05$) by ANOVA.

Table 2. Average number of spots and matches in two-dimensional gels of CAE seronegative (A-E) and seropositive (F-J) bucks.

Animal	R1	R2	Average number of spots	Matches
A	57	46	51.5	31
B	63	45	54	39
C*	108	100	104	69
D	15	12	13.5	4
E	49	43	46	32
F	137	98	117.5	62
G	61	54	57.5	21
H	160	63	111.5	23
I*	168	143	155.5	108
J	150	148	149	119

A - Animal 366; **B** - Animal 389; **C** - Animal 978; **D** - Animal 1147; **E** - Animal 1184; **F** - Animal 24; **G** - Animal 263; **H** - Animal 1098; **I** - Animal 1677; **J** - Animal 1690. **R1** – Reference gel. **R2** - Repetition. *Highest average number of spots. **Source:** Author.

Table 3. Similar proteins found in the seminal plasma of seronegative and seropositive CAE buck identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (ESI-Q-ToF). Table includes spots detected in 18-cm gels, obtained within the 4-7 pH interval.

Protein	Experimental kDa/pI	NCBI Accession number	MS/MS Mascot protein score	Sequence coverage (%)
Spermadhesin Z13-like [Capra hircus]				
Spot 153	15617/6.18	548523829	216	47
Spot 237	15617/6.18	548523829	68	22
Spot 263	15617/6.18	548523829	94	22
Spot 425	15617/6.18	548523829	66	22
Spot 671	15617/6.18	548523829	315	47
Spot 844	15617/6.18	548523829	508	70
Spot 863	15617/6.18	548523829	276	47
Spot 870	15617/6.18	548523829	166	47
Spot 999	15617/6.18	548523829	80	22
Bodhesin-2, partial [Capra hircus]				
Spot 830	11885/6.75	121484235	85	19
Spot 844	11885/6.75	121484235	187	37
Spot 855	11885/6.75	121484235	208	44
Spot 863	11885/6.75	121484235	225	44
Bodhesin [Capra hircus]				
Spot 708	11868/6.34	77864607	77	9
Spot 790	11868/6.34	77864607	86	9
Spot 813	11868/6.34	77864607	96	17
Spot 821	11868/6.34	77864607	73	9

Spot 829	11868/6.34	77864607	86	9
Predicted: seminal plasma protein PDC-109-like [Capra hircus]				
Spot 708	15083/5.43	548504897	168	40
Spot 756	15083/5.43	548504897	212	57
Spot 776	15083/5.43	548504897	106	22
Spot 790	15083/5.43	548504897	125	22
Spot 813	15083/5.43	548504897	218	57
Spot 834	15083/5.43	548504897	280	59
Spot 872	15083/5.43	548504897	263	58
Spot 883	15083/5.43	548504897	112	39
Lipocalin [Capra hircus]				
Spot 738	19568/6.51	633267628	322	44
Spot 744	19568/6.51	633267628	262	44
Albumin precursor [Capra hircus]				
Spot 269	68266/5.58	193085052	759	30
Spot 279	68266/5.58	193085052	1373	40
PREDICTED: beta- hexosaminidase subunit beta [Capra hircus]				
Spot 269	71091/7.62	548511578	98	5
Spot 279	71091/7.62	548511578	172	8

Table 4. Proteins of the seminal plasma of buck naturally infected with CAE identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (ESI-Q-ToF). Table includes differentials spots detected in 18-cm gels, obtained within the 4-7 pH interval.

Protein	Experimental kDa/pI	NCBI Accession number	MS/MS Mascot protein score	Sequence coverage (%)
PREDICTED: arylsulfatase A [Capra hircus]				
Spot 331	54588/5.23	548534356	199	11
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: bifunctional ATP- dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) [Capra hircus]				
Spot 360	58311/7.68	548527632	136	5
PREDICTED: cathepsin F isoform X1 [Capra hircus]				
Spot 425	39361/6.60	548528017	422	24
PREDICTED: disintegrin and metalloproteinase domain- containing protein 2-like isoform X1 [Capra hircus]				
Spot 458	85722/5.46	548524408	56	4
Spot 459	85722/5.46	548524408	140	<u>4</u>
PREDICTED: clusterin [Capra hircus]				
Spot 575 (1/1c)	53867/5.68	548476224	154	10
PREDICTED: carbonic anhydrase 2 [Capra hircus]				
Spot 618	34193/6.71	548493981	95	6
PREDICTED: LOW QUALITY				

PROTEIN: electron transfer flavoprotein subunit beta [Capra hircus]				
Spot 639	29458/6.55	548534450	215	15
Immunoglobulin lambda light chain F7-299 [Capra hircus]				
Spot 639	25188/5.92	61378762	66	14
PREDICTED: epididymal secretory glutathione peroxidase [Capra hircus]				
Spot 696	25345/6.95	548518188	284	40
Spot 703	25345/6.95	548518188	301	40

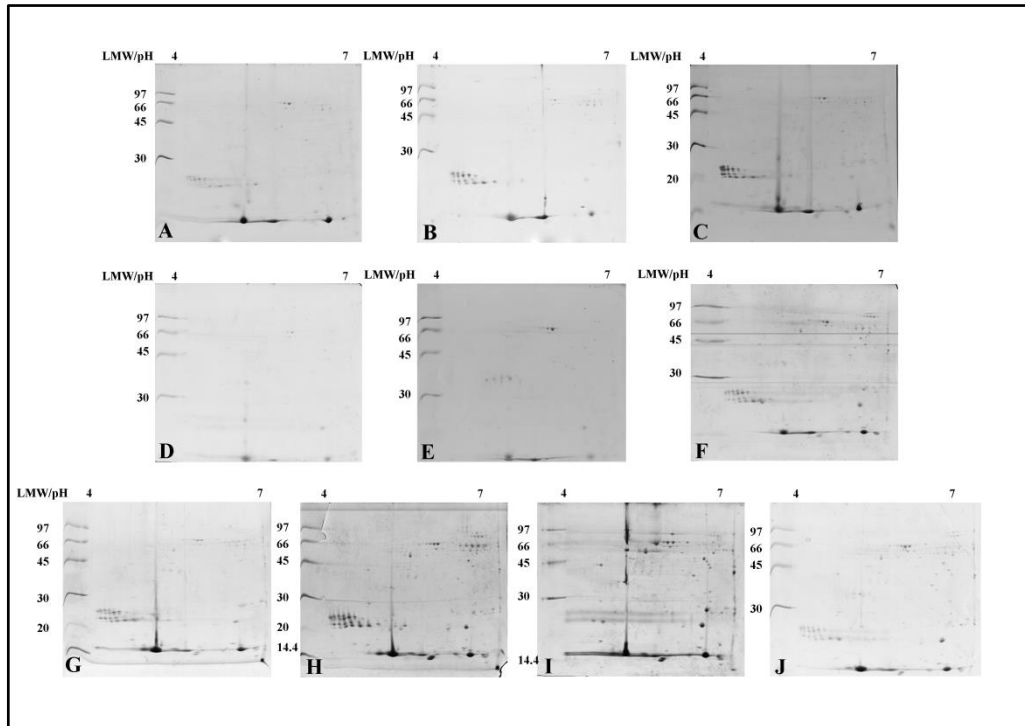


Fig 1. Two-dimensional profile of plasma seminal proteins of bucks. A-E represent the control group gels and F-J are seropositive group gels.

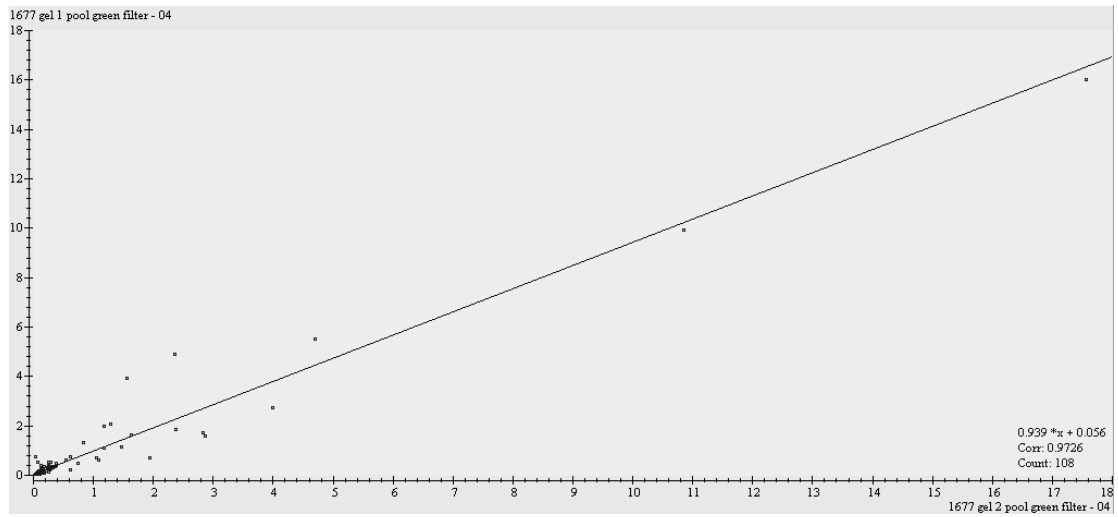


Fig. 2. Dispersion of gel 2D-PAGE duplicates considering the percentage volume (%Vol) of spots.

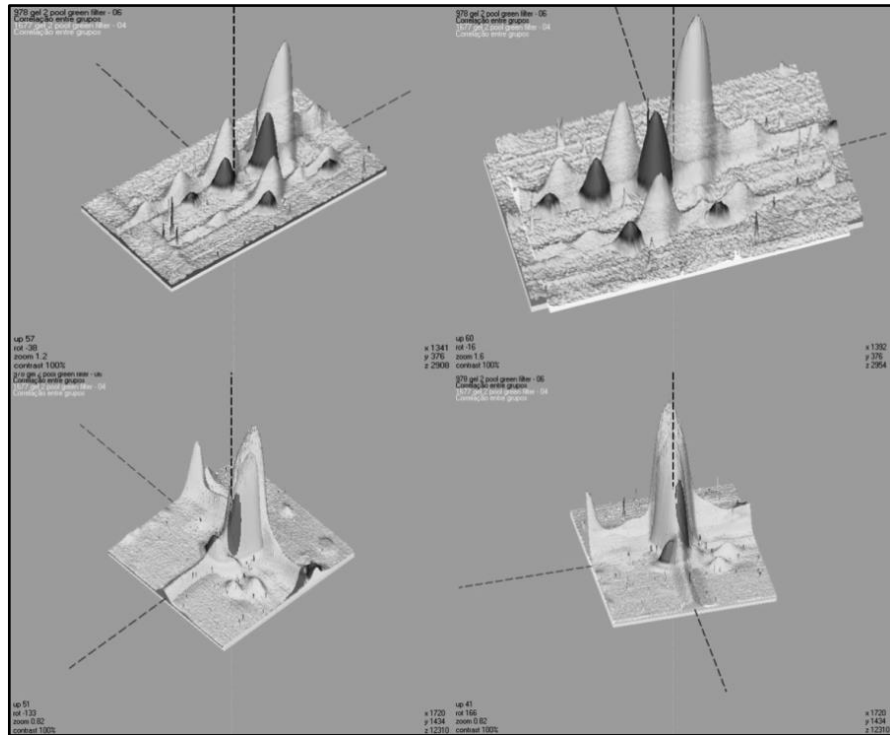


Fig. 3. 3D view spots/transparent mode. Seronegative (black) and seropositive (gray) CAE animals.

9 CONCLUSÕES

1. A elevada atividade das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9, formas latente e ativa) em reprodutores infectados cronicamente pela CAE sugere a presença de processo inflamatório em animais com e sem sintomatologia articular, possibilitando utilizar a atividade das MMPs como biomarcadores no monitoramento da infecção.
2. A eletroforese bidimensional associada a espectrometria de massa permitiu identificar no plasma seminal proteínas de resposta imune, relacionadas, possivelmente, ao quadro crônico da doença, configurando-se como ferramentas em potencial para melhor compreensão da doença a partir da identificação, quantificação e estudo das modificações pós traducionais destas proteínas.

10 PERSPECTIVAS

1. Este estudo se configura como um dos pioneiros na pesquisa e utilização da proteômica em doenças virais de caprinos, observando-se que a cronicidade da CAE em reprodutores caprinos pode ter sido a responsável pela maior expressão e atividade das proteínas no sangue e plasma seminal.
2. A eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa permitiu quantificar e identificar proteínas no plasma seminal de reprodutores soropositivos e correlacionar com o quadro crônico da doença, porém, a classificação dessas proteínas como biomarcadores exige maiores estudos voltada principalmente à análise individual de cada proteína e sua função na resposta imune inata à doença.
3. Avaliação futura da atividade das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) no monitoramento dos graus de infecção em caprinos infectados pelo CAEV.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J. L.; MCGUIRE, T. C.; GORHAM, J. R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *American journal of veterinary research*, v. 44, n. 9, p. 1670-1675., 1983.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. D. S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS D. O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 8, p. 1313-1319, 2006.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.; PINHEIRO, R.; ROCHA, M.; MARTINS, A.; SANTOS, D. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999.
- AZEVEDO, D. A. A.; SOUSA, A. L. M.; ARAÚJO, J. F.; MUNIZ, F.; MARANGUAPE, R.; ANDRIOLI, A.; ... Pinheiro, R. R. "Perfil eletroforético bidimensional do antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes: Dados preliminares." Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 7.; SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 13., 2012, Maceió. Anais... Maceió: Sociedade Nordestina de Produção Animal, 2012. 3 f. 1 CD-ROM., 2013.
- BEZERRA JÚNIOR R. Q.; ELOY, A. M. X.; PEREIRA, E. P.; FURTADO, J. R.; SOUZA, K. C.; LIMA, A. R.; ... TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação das metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com Artrite Encefalite Caprina na Região Semiárida do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 43, 2015.
- BRANDÃO, C. F. L.; CAMPOS, G. S.; SILVA, A. C. R.; TORRES, J. A.; TIGRE, D. M.; SARDI, S. I. Monoclonal antibodies against Caprine arthritis-encephalitis virus epitopes in the p28 and p55 gag viral proteins. *Journal of virological methods*, v. 187, n. 2, p. 352-356, 2013.
- BURGENER, A.; BOUTILIER, J.; WACHIHI, C.; KIMANI, J.; CARPENTER, M.; WESTMACOTT, G.; ... PLUMMER, F. Identification of differentially expressed proteins in the cervical mucosa of HIV-1-resistant sex workers. *Journal of proteome research*, v. 7, n. 10, p. 4446-4454, 2008.
- CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S. D.; TEIXEIRA, M. F. D. S. Lentiviruses of small ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.

CFSPH – The Center for Food Security and Public Health. College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa 50011. Caprine Arthritis Encephalitis, Small Ruminant lentivirus Infection. 2007.

CHANDONNET, L.; ROBERTS, K. D.; CHAPDELAINE, A.; MANJUNATH, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular reproduction and development*, v. 26, n. 4, p. 313-318, 1990.

CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B.; GORHAM, J. R.; PIPER, R. C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *Journal of Infectious Diseases*, v. 129, n. 2, p. 134-141, 1974.

DIAS, R. P.; GOMES, R. S. F.; ELOY, A. M. X.; FURTADO, J. R.; PINHEIRO, A. A.; PINHEIRO, R. R. "Perfil eletroforético de proteínas do plasma seminal de caprinos em géis de diferentes concentrações de poliacrilamida." Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SEMANA DA CAPRINOCULTURA E DA OVINOCULTURA BRASILEIRAS, 5., 2006, Campo Grande. Palestras e resumos. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; Embrapa Caprinos, 2006. Seção resumos. 4 f. 1 CD-ROM., 2007.

FRITZ, I. B.; BURDZY, K.; SÉTCHELL, B.; BLASCHUK, O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 28, n. 5, p. 1173–1188, 1983.

FRANKE, C. R. Controle sanitário da artrite encefalite caprina. Salvador: EDUFBA, 1998, 70p.

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B.; LOPES-CARDOZO, M. Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. *Biology of reproduction*, v. 45, n. 3, p. 381-386, 1991.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; MOLINEAUX, S.; CLEMENTS, J. E.; GHOTBI, Z. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 82, n. 20, p. 7086-7090, 1985.

GIL, L.; MARTÍNEZ, G.; GONZÁLEZ, I.; TARINAS, A.; ÁLVAREZ, A.; GIULIANI, A., ... LEÓN, O. S. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacological research*, v. 47, n. 3, p. 217-224, 2003.

GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPER, J. M.; WONGSTAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. *Proceedings National Academy Science. USA*, v. 83, p. 4007-4011, 1986.

GUEDES, K. M. R.; MUSTAFA, V. S.; PEDROSO, P. M. O.; DRIEMEIER, D.; XIMENES, F. H. B.; MELO, C. B.; BORGES, J. R. J.; CASTRO, M. B. Forma nervosa da artrite-encefalite caprina. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, n. 12, p. 2191-2194, 2013.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S. S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of reproduction*, v. 75, n. 4, 501-507, 2006.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª Edición. 513p.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) - 2014: EC 45, Edinburgh, July 2013. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/>. Acessado em 02/2015.

JELÍNKOVÁ, P.; MAŇÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 32, n. 3, p. 99-107, 2003.

KAMARUDDIN, M.; KROETSCH, T.; BASRUR, P. K.; HANSEN, P. J.; KING, W. A. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia*, v. 36, n. 5, p. 327-334, 2004.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.

LA FALCI, V. S. N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES, J. L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, v. 57, n. 3, p. 1035-1048, 2002.

LING, C. H.; FIRDAUS, F.; ABDULLAH, J.; ADAMU, L.; OSMAN, A. Y.; NORHAIZUM, D.; ... SAHAREE, A. A. Suspected Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE) in a Boer cross Kid: A Case Report. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, v. 5, n. 4, p. 35-40, 2013.

MANN, T. Experimental approach to study of semen and male reproductive function. *International Journal of Fertility*, v. 23, p. 133-137, 1978.

MATOUSEK, J. Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals (review). *Animal Reproduction Science*, v. 8, n. 1, p. 1-40, 1985.

MATRISIAN, L. M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genetics*, v. 6, p. 121–125, 1990.

MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. Í. A.; HAVT, A.; DA CUNHA, R. M. S.; MARTINS, D. B. G.; CASTELLETTI, C. H. M.; ... RÁDIS-BAPTISTA, G. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Molecular reproduction and development*, v. 75, p. 8-16, 2008.

MELO, A. C. M.; FRANKE, C. R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande fortaleza, Ceara, Brasil. *Ciência Rural*, v. 27, n. 1, 1997.

MOURA, A. A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *Journal of proteomics*, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, 2010.

MOURA, P. P.; FRANCO, M. M.; SILVA, T. A. S. N.; ROCHA, T. L.; LEAL, D. R.; PASSOS, P. I. B.; NEVES, J. P. Characterization of seminal plasma proteins and its relationship with quality parameters of frozen semen in ram. *Ciência Rural*, v. 40, n. 5, p. 1154-1159, 2010.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of andrology*, v. 27, n. 2, 201-211, 2006.

NARAYAN, O.; CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Review of Infectious Diseases*, v. 7, n. 1, p. 89-98, 1985.

OIE, B. B. "Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals." Office International des Epizooties, Paris, France, 2008, p. 983-991. NBR 6023.

PÉPIN, M., VITU, C., RUSSO, P., MORNEX, J. F., PETERHANS, E. Maedi-Visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary research*, v. 29, n. 3-4, p. 341-367, 1998.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; Alves, F. S. F.; Andrioli, A. Perfil de propriedades no estado do Ceará relacionado à presença do lentivírus caprino. *Ciência Animal*, v. 14, n.1, p. 29-37, 2004.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 31, n. 3, p. 449-454, 2001.

PUGH, D. G. *Clínica de ovinos e caprinos*. 513 p., São Paulo, Editora Roca Ltda., 2005, p. 269.

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. *European Journal of Biochemistry*, v. 242, n. 3, p. 636-640, 1996.

SANTOS, L. D. Palestra: "Estratégias e aplicações da Espectrometria de massas". In: Workshop em Métodos de estudo da estrutura e função de proteínas e peptídeos. Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rio de Janeiro - RJ. 2008.

SHABANOWITZ, R. B.; KILLIAN, G. J. Two-dimensional electrophoresis of proteins in principal cells, spermatozoa, and fluid associated with the rat epididymis. *Biology of reproduction*, v. 36, n. 3, p. 753-768, 1987.

SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O.; BRITO, R. L. L.; RODRIGUES, A. S.; SIDER, L. H.; ... ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, v. 109, n. 2, p. 193-198, 2013.

SOUZA, C. E. A.; REGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; NOGUEIRA, F. C.; DOMONT, G. B.; ... MOURA, A. A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Inês rams. *Journal of proteomics*, v. 75, n. 14, p. 4436-4456, 2012.

SOUZA, A. F.; LEITÃO, M. C. G.; BATISTA, A. M. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico ea qualidade do sêmen. *Ciência Rural*, v. 39, n. 4, 2009.

SOUZA, M. V.; FONTES, V.; RICART, C. A. O. Análise de proteomas – o despertar da era pós-genômica. *Revista online de biotecnologia, ciência e desenvolvimento (Brasil)*, v. 2, n. 7, p. 12-14, 1999.

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. *Animal Reproduction*, v. 6, n. 4, p. 516-525, 2009.

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. *Genetics and Molecular Research*, v. 5, n. 1, p. 79–87, 2006.

TEIXEIRA, D. I. A.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; HAVT, A.; BLOCH JR, C.; PRATES, M. V.; ... FREITAS, V. J. Isolation and partial characterization of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*), homologous to spermadhesins. *Protein and Peptide Letters*, v. 9, n. 4, p. 331–335, 2002.

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal reproduction science*, v. 89, n. 1, p. 159–170, 2005.

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, n. 4-5, p. 217–224, 1998.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology Endocrinology*, v. 1, n. 39, p. i0006-3363, 2003.

VISPO, N. S. *Combinatoria Molecular*. Elfos Scientiae. La Habana 10600, Cuba, 2004, 405p.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R., ... HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, v. 16, n. 1, p. 1090-1094, 1995.

WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H. R.; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, v. 6, n. 17, p. 4688-4703, 2006.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, 1991.

ZHANG, N.; ZHANG, Z.; FENG, S.; WANG, Q.; MALAMUD, D.; DENG, H. Quantitative analysis of differentially expressed saliva proteins in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected individuals. *Analytica chimica acta*, v. 774, p. 61-66, 2013.