



## Purificação de fração enriquecida de binder of sperm protein 1 (BSP 1) do fluido seminal bovino através da técnica de precipitação por sulfato de amônio

*Purification of enriched fraction of binder of sperm protein 1 (BSP1) from bovine seminal fluid by ammonium sulphate precipitation technique*

Andreza Rodrigues Viana<sup>1</sup>, Kamila de Sousa Otávio<sup>2</sup>, Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura<sup>2</sup>, Gustavo Ferrer Carneiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor, SN – Boa Vista – Garanhuns – PE, CEP 55.296-901; <sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia animal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

### Resumo

Objetivou-se no presente estudo realizar purificação parcial da proteína binder of sperm protein 1 (BSP1), proteína de 15 kDa presente nos fluidos das glândulas vesiculares de bovinos, por meio de precipitação com sulfato de amônio. O fluido seminal foi extraído das glândulas vesiculares obtidas de dez touros *Bos indicus* em abatedouro comercial de Fortaleza, Ceará. As glândulas foram transportadas e processadas no Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Federal do Ceará. Foi utilizado um coquetel inibidor de proteases, com posterior centrifugação. Um pool de todas as amostras foi armazenado a -20 °C e uma alíquota foi reservada para determinar a concentração de proteína. Para a precipitação de proteínas, foram adicionadas diferentes concentrações de sulfato de amônio. Foram realizados SDS-PAGE e Western blot com anticorpo específico. Obtivemos a presença de BSP1. Foi observada presença da proteína em todas as frações, porém, a fração 40-60% foi a que apresentou a maior concentração de BSP1, em média 98%. A técnica utilizada foi altamente eficaz e a purificação dessas proteínas possibilita uma melhoria na qualidade seminal *in vitro* e pode ser utilizada para obtenção de amostras altamente enriquecidas de BSPs, além de avaliar o potencial de fertilidade de reprodutores.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*, plasma seminal, proteína, sulfato de amônio.

### Abstract

*The objective of the present study was to partially purify binder of sperm protein 1 (BSP1) protein, a 15 kDa protein present in bovine vesicular gland fluids, by precipitation with ammonium sulfate. Seminal fluid was extracted from the vesicular glands obtained from ten Bos indicus bulls in a commercial slaughterhouse in Fortaleza, Ceará. The glands were transported and processed at the Animal Physiology Laboratory of the Federal University of Ceará. A protease inhibitor cocktail was used, with subsequent centrifugation. A pool of all samples was stored at -20 °C and an aliquot was set aside to determine protein concentration. For protein precipitation, different concentrations of ammonium sulfate were added. SDS-PAGE and Western blot were performed with specific antibody. We obtained the presence of BSP1. Protein presence was observed in all fractions, however, the 40-60% fraction presented the highest BSP1 concentration, on average 98%. The technique used was highly effective and the purification of these proteins allows an improvement in seminal quality in vitro and can be used to obtain highly enriched samples of BSPs, besides evaluating the fertility potential of breeders.*

**Keywords:** *Bos indicus*, seminal plasma, protein, ammonium sulfate.

### Introdução

Considerando a função do plasma seminal (PS), a análise dos fluidos reprodutivos fornece informações para a compreensão dos mecanismos que determinam a capacidade fecundante dos gametas masculinos (Moura et al., 2011). Os gametas são produzidos no testículo, amadurecem e são armazenados no epidídimo sendo eventualmente liberados na ejaculação quando misturados com secreções de acessórias glândulas sexuais. Neste ponto, proteínas seminais modulam vários aspectos funcionais do espermatozoide, incluindo capacitação espermática, fundamental para o processo de fertilização (Belleannee et al., 2011; Rego et al., 2014).

<sup>1</sup>Correspondência: andrezarviana@hotmail.com

Recebido: 08 de abril de 2019

Aceito: 26 de novembro de 2019



O fluido da vesícula seminal contém proteínas que participam de eventos relacionados à proteção dos espermatozoides (Kraus et al., 2005). Nesse aspecto, a binder of sperm protein 1 (BSP1) tem a capacidade de estabilizar a membrana espermática durante sua passagem pelo trato reprodutivo feminino (Manjunath e Therien, 2002) e mediar a ligação dos espermatozoides ao epitélio do oviduto (Hung e Suarez, 2012).

As proteínas Binder of sperm protein (BSP) foram identificadas pela primeira vez no PS bovino (Manjunath e Sairam 1987), representam aproximadamente 60% da proteína presente no fluido (Kelly et al., 2006; Moura et al., 2007). As BSPs foram isoladas e caracterizadas em outras espécies, incluindo o bode (Villemure et al., 2003), garanhão e cachaço (Calvete et al., 1997), javali (Lusignan et al., 2007), carneiro (Bergeron et al., 2005) e humanos (Lefieve et al., 2007). Foram também encontradas proteínas do tipo BSP1 em búfalo, camelo e alpaca (Harshan et al., 2009; Druart et al., 2013).

A solubilidade de uma proteína pode variar de acordo com a força iônica da solução e, portanto, de acordo com a concentração de sal (Moraes et al., 2013). O sal comumente utilizado é o sulfato de amônio, e por ser muito solúvel em água, geralmente apresenta-se como uma solução aquosa saturada que é diluída até que atinja concentração necessária, expressa como uma concentração percentual da solução saturada (uma solução a 100%) (Jump, 2013). A precipitação por sulfato de amônio é um método usado para purificar proteínas alterando sua solubilidade, através da técnica conhecida como *salting out*. Este sulfato é comumente utilizado por ter uma solubilidade muito alta, o que permite soluções salinas com elevada força iônica (Moraes et al., 2013).

O processo de purificação das proteínas tem como principal objetivo a obtenção de uma amostra para melhor compreensão de suas características estruturais e bioquímicas, além de um produto com maior atividade específica para aplicação em diversos processos (Koblitz et al., 2004). Com isso, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de purificar a BSP1, uma proteína de 15 kDa presente no líquido da vesícula seminal de touros *bos indicus*, através da precipitação por sulfato de amônio.

## Material e Métodos

### Coleta e processamento do fluido seminal bovino

O fluido seminal foi obtido de glândulas vesiculares colhidas de dez touros *bos indicus* em um abatedouro comercial da região metropolitana de Fortaleza, Ceará, Brasil. As glândulas foram identificadas e transportadas em recipiente refrigerado (temperatura de 2 a 10 °C) para o Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará.

Após dissecadas, uma incisão longitudinal de 2 cm foi feita em cada glândula com o auxílio de um bisturi. Em seguida, as glândulas foram gentilmente massageadas na incisão para extração do fluido, obtendo um volume de 5,8 mL, que foi armazenado em tubos Falcon de 15 mL. Imediatamente após a extração, um coquetel de inibidor de protease (Sigma Aldrich, USA) foi adicionado na proporção 1:1000 ao fluido das glândulas vesiculares e, em seguida centrifugou-se a solução (700g, 4 °C/15 min), logo após o sobrenadante foi pipetado em tubos Falcon limpos de 15 mL sendo novamente centrifugado (5000g, 4 °C, 60 min), para separar os artefatos celulares do sobrenadante.

Foi realizado um pool de todas as amostras para uniformizar o conteúdo e foram feitas alíquotas de 1,0 mL, armazenando-as a -20 °C. Uma alíquota foi utilizada para determinar a concentração de proteína seguindo metodologia descrita por Bradford (1976).

### Precipitação das proteínas do fluido seminal bovino com sulfato de amônio

Imediatamente após a extração, adicionou-se uma mistura de inibidores de proteases numa proporção de 1:1000 no fluido e depois centrifugou-se (9000g, 4 °C/15 min) para separar os artefatos celulares do sobrenadante. O sobrenadante foi submetido à precipitação por sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de acordo com o volume da amostra, empregando cinco intervalos de saturação: 0-20% (g/L), 20-40% (g/L), 40-60% (g/L), 60-80% (g/L), 80-100% (g/L), de acordo com Scopes (1994).

Essas frações foram ressuspensas (solução: tampão tris-HCl 0,1 M, pH 7,6), em seguida, foram então dessalinizadas por meio de diálise, na qual foram realizadas oito trocas de água em intervalo de uma hora cada, seguida de uma liofilização por 48h a -50 °C e pressão mínima de 0,035 mBar. Para verificar o processo de purificação, foram realizados a Dodecil-sulfato de sódio-Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot com anticorpo específico para confirmar a presença de BSP1 na amostra.



### **Eletroforese unidimensional**

Amostras liofilizadas da fração enriquecida de BSP1 obtidas através de precipitação com sulfato de amônio, foram ressuscendidas em 200 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, e as proteínas quantificadas por meio do método de Bradford (1976). Para a eletroforese, foram utilizados 20 µg de proteínas do fluido das glândulas vesiculares (controle positivo), e 20 µg de cada fração recuperada nos cinco intervalos de saturação durante o processo de precipitação, adicionados de tampão de corrida de acordo com a quantidade de proteína calculada para 20 µg da amostra (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% (v/v) glicerol, 0,2 M DTT, 0,02% azul de bromofenol). As amostras foram aquecidas por 90 segundos, e pipetadas nos poços do gel de concentração (4% de acrilamida), colocado sobre um gel de corrida de 12,5% de acrilamida. Para a corrida eletroforética foi utilizado o seguinte padrão da eletroforese (SE600 Ruby, GE Healthcare): 500V, 25mA/gel, 90W. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue (CBBR250) “overnight” e descorado após lavagens com soluções contendo etanol (40%), ácido acético (10%) e água destilada (50%). Os géis foram digitalizados com o auxílio do ImageScanner (GE Healthcare, USA) a 300 dpi.

### **Western blot**

O fluido das glândulas vesiculares e as frações precipitadas foram avaliados com Western blot. Resumidamente, 20 µg de proteínas totais do fluido das glândulas vesiculares, seguido das frações enriquecidas de BSP1, foram separados de acordo com seu peso molecular por meio de SDS-PAGE em gel de acrilamida (12,5%). Proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF (Hybond-P, GE Lifesciences, USA) utilizando uma unidade de transferência (TE 70, GE Lifesciences, USA). As membranas foram bloqueadas “overnight” a 4 °C, submersas em mistura de 30 mL de PBS-T (PBS + 0,5% de Tween20) e 5% de leite desnatado, seguido de 1 hora de incubação com anticorpo primário contra a BSP1 bovina (1:6000). A membrana de PVDF foi lavada três vezes com PBS-T por dez minutos, seguida de 1 hora de incubação com anticorpo secundário (1:5.000 DnkpAbto Rb IgG; AbcamorDonkeyanti-rabbit) e então enxaguados três vezes com PBS-T por dez minutos. A imunorreacção foi visualizada após a exposição da membrana ao substrato fosfatase alcalina BCIP/NBT (Sigma Aldrich, USA). A reação foi parada após lavar a membrana com água ultrapura.

### **Resultados e Discussão**

Nesse estudo foi possível se obter uma fração altamente purificada (em torno de 98%) e enriquecida de BSP1 a partir do fluido das vesículas seminais de touros, utilizando-se a técnica de precipitação por sulfato de amônio. Com base nestes resultados, é possível afirmar a eficácia e aplicabilidade da purificação de fração enriquecida de BSP 1 do fluido seminal bovino através da técnica de precipitação por sulfato de amônio. Pois, foi observada a modulação da função espermática pela utilização das proteínas provenientes do PS. Já que para Moura et al. (2011), as relações entre algumas destas proteínas associadas a índices de fertilidade em determinadas espécies indicam que elas são potenciais marcadores moleculares da capacidade reprodutiva.

No que se refere a precipitação de proteínas, várias são as metodologias utilizadas pela literatura, desde sais neutros como o cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e mais frequentemente o sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Doonan, 2004) porém solventes orgânicos também podem ser utilizados, como o metanol, etanol, butanol e mais comumente a acetona (Simpson; Beynon, 2010). A utilização do sulfato de amônio evidenciou um alto enriquecimento e rendimento, fato atribuído por Tscheliessnig et al. (2014) a uma solubilização parcial das proteínas precipitadas com os solventes orgânicos, ou seja, uma reação intramolecular promovida pela acetona e metanol o que altera a proteína e sua solubilidade. Além disso, Wang et al. (2013) afirmam que a utilização do (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> promove menores riscos à perda das propriedades proteicas em decorrência da instabilidade e precipitação promovida.

Por meio da análise do perfil proteico da BSP1, a SDS-PAGE demonstrou a presença desta proteína em todas as frações. Porém, a fração 40-60% foi a que apresentou a maior concentração de BSP1, se comparado com as demais frações, ainda foi possível observar a presença, mesmo que em pequenas quantidades da BSP5 (figura 1).

Foi constatada a presença da BSP1 em todas as frações analisadas, por se tratar de proteínas com a maior participação no plasma seminal bovino, fato já descrito por Moura et al. (2007). A maior

concentração de BSP1 observada na fração 40-60% em relação as outras frações pode ser explicada por diferenças no mecanismo de ação para precipitação das proteínas, já que para Duong-Ly e Gabelli (2014), a utilização de sais neutros (sulfato de amônio) promove uma redução na concentração ideal de água superficial, sugerindo que nas outras frações ocorreram alterações nesta redução ou que a solubilização parcial das proteínas foram em concentrações menores do que na presente fração. Uma outra possível explicação para este resultado, é baseada no tempo de exposição e manuseio do PS enriquecido com BSP, já que a exposição prolongada a estas condições durante o manuseio *in vitro* pode ser prejudicial (Manjunath et al., 2007).

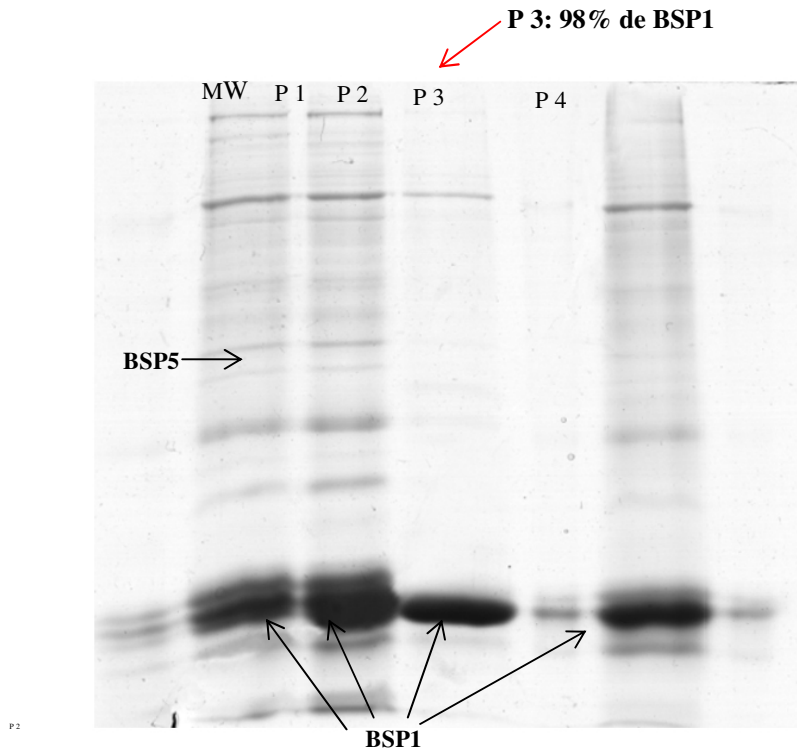


Figura 1- Frações de BSP1 bovino detectadas pelo Dodecil-sulfato de sódio-Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em diferentes concentrações de Sulfato de Amônio. MW= Marcador; P1= Fração 0-20%; P2= Fração 20-40%; P3= Fração 40-60% e P4= sobrenadante. Fonte: Autor

Um dos agravantes na precipitação de proteínas está relacionado a forma do sal utilizado e velocidade ideal de adição, ou seja, adição do sulfato de amônio à solução do plasma, pois dependendo destas ações podem-se formar grumos do sal ou a precipitação de proteínas indesejadas, comprometendo assim a precipitação (Harris, 1992).

A presença mesmo que em pequenas quantidades da BSP5 é atribuída a diferenças na localização espermática destas proteínas, já que aproximadamente um terço dos espermatozoides exibe ligação de BSP1 e BSP5 sobre a superfície espermática diferentes. Além disso, segundo Pini et al. (2018), tanto a BSP1 quanto a BSP5 provavelmente agem sinergicamente, mesmo que com papéis e localizações ligeiramente diferentes. O que para Manjunath e Therien (2002) está relacionado ao fato de que BSP5 seja outro BSP bovino homólogo, então ambas proteínas possuem dois domínios da fibronectina tipo II. Com isso, é possível indicar que bioquimicamente, a BSP1 e BSP5 interagem com o esperma da mesma maneira, modulam as atividades de ligação e compartilham semelhanças funcionais.

Outras pesquisas envolvendo a purificação de BSP1 *in vitro* em bovinos já foram descritas por Moura e Memili (2016), Plante et al. (2016) e Rodríguez-Villamil et al. (2016), comprovando a capacidade das BSP's de induzir a capacitação dos espermatozóides.

Portanto, as BSPs apresentam uma alta correlação com fertilidade de touros (seja *in vivo* ou *in vitro*) e estes estudos nos permite hipotetizar que as BSPs podem servir como proteínas adjuvantes na qualidade seminal, além de potenciais indicadores da reprodução dos machos. Porém, como relatado por



outros trabalhos, as vias fisiológicas e o mecanismo molecular associado as respostas das BSP's deve ser mais investigado.

### Conclusões

Os setores responsáveis pela produção animal demandam maiores índices de produtividade. A purificação das proteínas demonstrada nesse estudo possibilita uma matéria prima profícua e pode servir como base para diferentes experimentos avaliando tanto a qualidade seminal quanto o seu efeito na qualidade espermática *in vitro*, assim como o potencial de fertilidade dos reprodutores.

Assim, podemos concluir que a técnica de precipitação por Sulfato de Amônio foi altamente eficaz para purificação da proteína BSP1, demonstrando que esta técnica pode ser utilizada para obtenção de amostras altamente enriquecidas de BSPs.

### Agradecimentos

A equipe do laboratório de Fisiologia Animal da UFC, Arabela Guedes, Denize Azevedo, Moêmia Portela, Kamila Otávio, Maria Julia Barbosa, e ao Professor Arlindo Moura por toda ajuda e acolhimento durante o período que passei em Fortaleza.

### Referências

- Belleannee C, Belghazi M, Labas V, Teixeira Gomes AP, Gatti JL, Dacheux JL, Dacheux F.** Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*, v.11, n.10, p.1952-1964, 2011.
- Bradford MM.** *Anal Biochem*, v.72, p.248, 1976.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P.** Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev*, v.71, p.461-70, 2005.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E.** Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett*, v.407, p.201-206, 1997.
- Doonan S.** Bulk purification by fractional precipitation. *Methods molbiol*, v.244, p.117-124, 2004.
- Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG, de Graaf SP.** Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics*, v.8, p.13-22, 2013.
- Duong-Ly KC, Gabelli SB.** Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol*, v. 541, p.85-94, 2014.
- Harris ELV.** Concentration of the extract. In: Harris ELV, Angal S (Ed.). *Protein purification methods: a practical approach*. New York: IRL, p.125-161, 1992.
- Harshan HM1, Sankar S, Singh LP, Singh MK, Sudharani S, Ansari MR, Singh SK, Majumdar AC, Joshi P.** Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. *Anim Reprod Sci*. Oct;115(1-4):306-11, 2009.
- Hung PH, Suarez SS.** Alterations to the bull sperm surface proteins that bind sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod*. Oct, v.4, p.18-87, 2012.
- Jump UP.** Ammonium Sulfate Calculator. *En Cor Biotechnology Inc*. Accessed in: 19 April, 2013.
- Kelly VC, Palmer DJ, Xu Z, Davis SR, Cooper GJ.** Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics*, v.6, p.5826-5833, 2006.
- Koblitz MGB, Pastore M.G.** Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. *Ciência e Tec. de Alim.*, v.24, p.287-292, 2004.
- Kraus M, Tichá M, Zelezná B.** Characterization of human seminal plasma protein homologous to boar AQN spermadhesins. *J Reprod Immunol*, v.65, p.33-46, 2005.
- Lefievre L, Bedu-Addo K, Conner SJ, Machado-Oliveira GS, Chen Y, Kirkman-Brown JC.** Counting sperm does not add up any more: time for a new equation? *Reproduction*, v.133, p.675-84, 2007.
- Lusignan MF, Bergeron A, Crete MH, Lazure C, Manjunath P.** Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biol Reprod*, v.76, p.424-32, 2007.
- Manjunath P, Therien I.** Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v.53, p.109-19, 2002.





- Manjunath P, Sairam MR.** Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J*, v.241, p.685–92, 1987.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J e Fan J.** Seminal plasma proteins: Functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.65, p.217-228, 2007.
- Moraes CS, Oliveira Junior FOR, Masson G, Rebello KM, Santos LO, Bastos NFP, Faria RCR.** Métodos experimentais no estudo de proteínas. (Série em biologia celular e molecular). Rio de Janeiro: IOC, p.84, 2013.
- Moura AA, Andrade CR, Souza CEA, Rego JPA, Martins JAM, Oliveira RV, Menezes EBS.** Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, n.2, p.139-144, 2011.
- Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ.** A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.169-188, 2007.
- Moura AAA, Memili E.** Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. *Anim Reprod*, v.13, n.3, p.191-199, Jul./Sept, 2016.
- Pini T, Graaf SP, Druart X, Tsikis G, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Gadella BM, Leahy T.** Binder of Sperm Proteins 1 and 5 have contrasting effects on the capacitation of ram spermatozoa. *Biol Reprod*, Jun 1;98(6):765-775, 2018.
- Plante G, Prud'homme B, Fan J, Lafleur M, Manjunath P.** Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell Tissue Res*, v.363, p.105–127, 2016.
- Rego JP, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, Corbet NJ, Corbet DH, Burns BM, Boe-Hansen GB, McGowan MR.** Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim. Reprod. Sci*, v.148, p.1–17, 2014.
- Rodríguez-Villamil P, Hoyos-Marulanda V, Martins JAM, Oliveira AN, Aguiar LH, Moreno FB, Velho ALMCS, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Vasconcelos IM, Bertolini M, Moura AA.** Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. *Theriogenology*, v.85, p.540–554, 2016.
- Simpson DM, Beynon RJ.** Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. *Jour. of Prot. Res.*, v.9, p.444–450, 2010.
- Tscheliessnig A, Satzer P, Hammerschmidt N, Schulz H, Helk B, Jungbauer A.** Ethanol precipitation for purification of recombinant antibodies. *Jour. of Biotec.* v.188, p.17–28, 2014.
- Villemure M, Lazure C, Manjunath P.** Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.1- 10, 2003.
- Wang F, Li X, Mo X, Zhang G, Sun H.** A biologically active vMIP-II-IgG3-TfN fusion protein, secreted from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Prot. Exp.and Purif.*, v.87, n.1, p.47–54, 2013.
-