

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Clonagem, expressão e produção de proteínas recombinantes do plasma seminal de bovinos para potencial uso em meios de congelamento de sêmen

Tayná Bolsam da Silva
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

TAYNÁ BOLSAM DA SILVA

Clonagem, expressão e produção de proteínas recombinantes do plasma seminal de bovinos para potencial uso em meios de congelamento de sêmen

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Mariana Machado Neves

Coorientadora: Geniana da Silva Gomes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586c
2025
Silva, Tayná Bolsam da, 1998-
Clonagem, expressão e produção de proteínas
recombinantes do plasma seminal de bovinos para potencial uso
em meios de congelamento de sêmen / Tayná Bolsam da Silva. –
Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (82 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2025.

Referências bibliográficas: f. 71-82.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.692>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Reprodução. 2. Proteínas recombinantes.
3. Sêmen - Criopreservação. 4. Bovinos - Espermatozóides. 5.
Osteopontina. 6. Espermadesina. I. Neves, Mariana Machado,
1977-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.20824

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

TAYNÁ BOLSAM DA SILVA

Clonagem, expressão e produção de proteínas recombinantes do plasma seminal de bovinos para potencial uso em meios de congelamento de sêmen

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2025.

Assentimento:

Tayná Bolsam da Silva
Autora

Mariana Machado Neves
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 24/10/2025 às 12:25:37 e pela orientadora em 24/10/2025 às 15:31:56. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **6BVZ.H3UI.QV1V** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que escreveu esta história muito antes de eu imaginá-la. Pela graça, pelo amor imenso e pela presença constante que me sustentou nos dias bons e, principalmente, nos difíceis. Por nunca me deixar desistir, e por me lembrar todos os dias que os planos d'Ele são sempre maiores e melhores que os meus.

Ao meu marido, Caio Henrique Binda de Assis, obrigada por acreditar em mim quando até eu mesma duvidei, por enxugar minhas lágrimas, comemorar minhas conquistas e ser meu porto seguro em todas as fases dessa jornada, e sempre.

Aos meus pais, Karielly Bolsam da Silva e Marivaldo Pereira da Silva, e a toda a minha família, onde encontrei amor, paciência e fé. Em especial às minhas tias Marinilda Pereira da Silva e Marissandra Pereira da Silva, por estarem sempre presentes nos momentos importantes da minha vida, mesmo longe fisicamente, sinto vocês perto em cada conquista, com todo o amor.

Em memória de minha avó, Dilma Venturini, a quem devo grande parte de quem eu sou. O amor que recebi da senhora é uma das maiores riquezas que carrego na vida. Cada vitória que conquisto tem um pedacinho seu. Te levo comigo em cada passo, com imensa saudade e um amor que jamais será esquecido.

Em memória do meu tio, Fabricio Ronei Thomasi, que sempre me apoiou com muito amor, orgulho e incentivo para seguir meus estudos. Seu amor me acompanhou e me acompanha em cada desafio.

A minha orientadora, Mariana Machado Neves, pela oportunidade de desenvolver meu projeto de mestrado no Laboratório de Biologia Estrutural e Laboratório de Biotecnologia Molecular. Sou grata pela orientação e pela confiança depositada em mim durante esses anos.

A minha coorientadora, Geniana da Silva Gomes, por todo o apoio, ensinamentos e contribuição em todas as etapas desse trabalho. Agradeço também a doutoranda Tarciza, pelo incentivo e troca de conhecimento que tornaram o percurso mais leve e produtivo.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, agradeço por compartilharem

comigo os cafés, por todas as gargalhadas, os desafios e imprevistos dos experimentos, os chororôs, e as vitórias que comemoramos juntos. Levo comigo cada momento que passamos juntos, com muita gratidão e amor. Deixo um carinho especial aos queridos “patinhos e pintinhos”, que tornaram essa caminhada mais leve e divertida. E à minha amiga Shara, que caminhou comigo desde o início, meu coração se enche de gratidão por tudo o que vivemos juntas durante todo esse processo, uma apoiando e fortalecendo a outra. Quero também agradecer com todo carinho a Isabella Ester, que me acompanhou como estagiária, sempre atenta, carinhosa e disposta a ajudar, trazendo luz e leveza para minha jornada.

Aos membros da banca, agradeço pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de aprimoramento profissional e pessoal.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

A todos que, de alguma forma, caminharam comigo nesse processo, meu mais sincero obrigada. Cada gesto, palavra e presença fizeram toda a diferença nessa caminhada.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

"Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar." Josué

1:9

RESUMO

SILVA, Tayná Bolsam da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **Clonagem, expressão e produção de proteínas recombinantes do plasma seminal de bovinos para potencial uso em meios de congelamento de sêmen.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientadora: Geniana da Silva Gomes.

A criopreservação de sêmen ainda representa um desafio significativo para a reprodução de diversas espécies de interesse zootécnico, especialmente devido às diferenças naturais na criotolerância dos gametas entre elas. Embora o plasma seminal seja removido durante o processo de criopreservação, vários estudos têm destacado seus efeitos benéficos sobre a proteção espermática, principalmente devido à presença de proteínas com propriedades protetoras. Diante disso, a utilização de proteínas recombinantes derivadas do plasma seminal de espécies com maior tolerância ao congelamento, como os bovinos, surge como uma alternativa promissora para melhorar a qualidade do sêmen de espécies mais sensíveis à criopreservação. O objetivo deste estudo foi produzir, expressar e purificar as proteínas recombinantes Binder of sperm protein (BSP5), Espermedesina (SPAD1) e Osteopontina (OPN) do plasma seminal bovino, espécie utilizada como modelo em razão de sua reconhecida tolerância à criopreservação. Foram testadas diferentes cepas da bactéria *Escherichia coli* utilizando o vetor de expressão pET28a. A expressão foi realizada em pequena e larga escala, seguida de purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, utilizando o sistema ÄKTA Start. A pureza das proteínas foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida, a concentração determinada pelo método Qubit, e a identidade confirmada por Western blotting. A cepa Arctic Express apresentou os melhores resultados para a expressão das proteínas recombinantes escolhidas. As proteínas BSP5 e SPAD1 foram produzidas, expressas e purificadas com sucesso, sendo obtidas em concentrações satisfatórias. No entanto, não foi possível expressar a proteína recombinante OPN. Os resultados obtidos mostraram que a metodologia empregada foi eficaz para a produção, expressão e purificação das proteínas BSP5 e SPAD1.

Palavras-chave: proteína recombinante; criopreservação; espermatozoide; osteopontina; espermedesina 1

ABSTRACT

SILVA, Tayná Bolsam da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **Cloning, expression, and production of recombinant seminal plasma proteins from bovines for potential use in frozen semen extender.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-adviser: Geniana da Silva Gomes.

Semen cryopreservation remains a significant challenge for the reproduction of various livestock species, especially due to natural differences in gamete cryotolerance among them. Although seminal plasma is typically removed during the cryopreservation process, several studies have highlighted its beneficial effects on sperm protection, mainly due to the presence of proteins with protective properties. In this context, the use of recombinant proteins derived from the seminal plasma of species with higher cryotolerance, such as cattle, emerges as a promising alternative to improve semen quality in more cryosensitive species.

The aim of this study was to produce, express, and purify the recombinant proteins Binder of Sperm Protein (BSP5), Spermadhesin (SPAD1), and Osteopontin (OPN) from bovine seminal plasma, a species used as a model due to its recognized tolerance to cryopreservation. Different strains of *Escherichia coli* were tested using the pET28a expression vector. Protein expression was performed on small and large scales, followed by affinity chromatography purification using a nickel column on the ÄKTA Start system. Protein purity was assessed by polyacrylamide gel electrophoresis, concentration was determined using the Qubit method, and identity was confirmed by Western blotting. The Arctic Express strain showed the best results for the expression of the selected recombinant proteins. BSP5 and SPAD1 proteins were successfully produced, expressed, and purified, and obtained in satisfactory concentrations. However, the expression of recombinant OPN was not successful. The results demonstrated that the methodology employed was effective for the production, expression, and purification of BSP5 and SPAD1 proteins.

Keywords: recombinant protein; cryopreservation; spermatozoa; osteopontin; spermadhesin1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação do mapa circular do vetor de expressão pET-28a(+). Fonte: SnapGene.....	29
Figura 2. Esquema ilustrativo da metodologia empregada para a produção e purificação das proteínas recombinantes. O diagrama resume as etapas de clonagem gênica até a confirmação das clonagens por PCR	30
Figura 3. Esquema ilustrativo da metodologia empregada para a produção e purificação das proteínas recombinantes. O diagrama resume as etapas de indução da expressão de proteínas recombinantes até a filtragem das amostras	35
Figura 4. Esquema ilustrativo da metodologia empregada para a produção e purificação das proteínas recombinantes. O diagrama resume as etapas de purificação das proteínas recombinantes até a obtenção das amostras finais	40
Figura 5. Resultado da análise BLASTp da sequência da proteína OPN (Osteopontina) na família <i>Suidae</i> - (taxid:9821).....	42
Figura 6. Resultado da análise BLASTp da sequência da proteína SPAD1 (Espermadesina 1) na família <i>Suidae</i> - (taxid:9821).....	42
Figura 7. Resultado da análise BLASTp da sequência da proteína BSP5 (Binder of Sperm Protein 5) na família <i>Suidae</i> - (taxid:9821).....	43
Figura 8. Resultado da predição do peptídeo sinal da proteína OPN (Osteopontina).....	44
Figura 9. Resultado da predição do peptídeo sinal da proteína SPAD1 (Espermadesina 1).....	44
Figura 10. Resultado da predição do peptídeo sinal da proteína BSP5 (Binder of Sperm Protein 5).....	44

Figura 11. Resultado da tradução da sequência de DNA da proteína OPN (Osteopontina).	47
Figura 12. Alinhamento da sequência da proteína recombinante OPN (OPN_Bov_recomb) com a sequência nativa (OPN_Bov).	47
Figura 13. Resultado da tradução da sequência de DNA da proteína SPAD1 (Espermadesina 1).	47
Figura 14. Alinhamento da sequência da proteína recombinante SPAD1 (SPAD1_Bov_recomb) com a sequência nativa (SPAD1_Bov).	48
Figura 15. Resultado da tradução da sequência de DNA da proteína BSP5 (Binder of Sperm Protein 5).	48
Figura 16. Alinhamento da sequência da proteína recombinante BSP5 (BSP5_Bov_recomb) com a sequência nativa (BSP5_Bov).	48
Figura 17. Confirmação da clonagem dos genes das proteínas OPN, SPAD1 e BSP5 no vetor de expressão pET28a, por eletroforese em gel de agarose.	50
Figura 18: Inserção dos clones pET28a/SPAD1-3, pET28a/BSP5-1 e pET28a/OPN-1 nas diferentes cepas.	52
Figura 19: Teste de expressão 6xhis-SPAD1.	53
Figura 20: Confirmação por Western blotting do teste de expressão de 6xhis-SPAD1 e 6xhis-BSP5, marcada com anticorpo anti-His.	55
Figura 21: Placas de Petri de com ágar sólido contendo as culturas da cepa Artic Express de BSP5 (A) e SPAD1 (B), após incubação a 37°C por 16 horas.	57
Figura 22: Western blotting anti-His da expressão de proteínas em larga escala por sistema de transferência semi-seco de SPAD1 e BSP5.	60
Figura 23: Purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de SPAD1, com início do pico na fração 6 e final na fração 15.	61

Figura 24: Purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de BSP5, com início do pico na fração 6 e final na fração 15.	62
Figura 25. Eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida da purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de SPAD1 e BSP5.	63
Figura 26. Eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida da purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de SPAD1 e BSP5.	64
Figura 27. Western blotting da purificação de por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes SPAD1 e BSP5.	68
Figura 28: Western blotting da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes SPAD1 e BSP5 obtidas a partir do corpo de inclusão.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de primers promotor T7 vetor pET28a.....	32
Tabela 2. Reação padrão utilizada para preparo de PCR.	32
Tabela 3. Programa de PCR aplicado o par de primer T7.....	32
Tabela 4. Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) das amostras de SPAD1 e BSP5	58
Tabela 5. Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) nas frações purificadas de SPAD1 e BSP5.....	65
Tabela 6. Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dos pools de SPAD1 e BSP5. ...	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
BSP5	<i>Binder of sperm protein 5</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CI	Corpo de inclusão
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FS	Fração solúvel
g	Gramma
IA	Inseminação artificial
IMAC	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	KiloDalton
LB	Meio Luria-Bertani
M	Molar
mA	Miliampère
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Min	Minutos
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
nm	Nanômetro
DO ₆₀₀	Densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm
OPN	Osteopontina
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	Tampão fosfato salino com Tween 20%
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
p/v	Peso por volume
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
seg	Segundos
SPAD1	Espermadesina 1
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volts
v/v	Volume por volume
μL	Microlitro
μg	Micrograma
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Sêmen e plasma seminal.....	18
2.2	Principais proteínas do plasma seminal	19
2.3	Papel das proteínas na criopreservação	21
2.4	Proteínas recombinantes	23
2.5	Aplicação de proteínas recombinantes na criopreservação animal	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Considerações éticas	28
4.2	Local do experimento.....	28
4.3	Clonagem	28
4.3.1	Confirmação das clonagens.....	30
4.3.2	Transformação por choque térmico	30
4.3.3	Extração manual de DNA plasmidial	31
4.3.4	PCR	32
4.4	Expressão de Proteínas	33
4.4.1	Transformação por choque térmico em cepas de expressão.....	33
4.4.2	Testes de expressão em pequena escala.....	34
4.4.3	Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE).....	35
4.4.4	Western blotting.....	36
4.5	Expressão de proteínas em larga escala.....	36
4.5.1	Expressão	36
4.6	Quantificação das proteínas utilizando o método de Bradford	38
4.6.1	Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) e Western blotting.....	39
4.7	Purificação de Proteínas	39
4.7.1	Filtração das proteínas	39
4.7.2	Purificação das proteínas por Qubit.....	39
4.8	Quantificação das proteínas	40
4.8.1	Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) e Western blotting.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Bioinformática.....	41

5.2	Confirmação das clonagens.....	50
5.3	Expressão das proteínas recombinantes em pequena escala.....	51
5.3.1	Testes de cepa.....	51
5.3.2	Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE).....	52
5.3.3	Western blotting.....	54
5.4	Expressão das proteínas recombinantes em larga escala.....	57
5.4.1	Cultivo bacteriano.....	57
5.4.2	Quantificação por Bradford.....	58
5.4.3	Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) e Western blotting.....	58
5.4.4	Purificação das proteínas.....	60
5.4.5	Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE).....	62
5.4.6	Quantificação por Qubit.....	65
5.4.7	Western blotting.....	67
6	CONCLUSÃO GERAL.....	70
7	REFERÊNCIAS.....	71

1 1 INTRODUÇÃO GERAL

2 A busca por maior eficiência reprodutiva é um dos principais desafios
3 enfrentados na produção animal em todo o mundo (Pence et al., 2007; Baruselli
4 et al., 2017; Evans et al., 2020; Peris-Frau et al., 2020; Lima et al., 2020). Apesar
5 dos esforços direcionados ao melhoramento genético dos animais e ao
6 aprimoramento das técnicas de manejo e nutrição, ainda persistem lacunas
7 importantes em relação a fertilidade, principalmente dos machos (Nielsen et al.,
8 2013).

9 Nas últimas décadas, biotecnologias reprodutivas, como a inseminação
10 artificial (IA), têm sido amplamente adotadas globalmente, promovendo a
11 otimização da eficiência reprodutiva em diversos sistemas de produção
12 (Waberski et al., 2019; Knox, 2016; Bailey et al., 2003). Na suinocultura, espécie
13 de interesse à qual os resultados deste trabalho serão futuramente aplicados,
14 esse panorama se repete: a IA é amplamente adotada, sendo responsável por
15 mais de 90% das coberturas, o que tem contribuído significativamente para o
16 aumento da produtividade global e o melhoramento genético da espécie (Pérez-
17 Patiño et al., 2018; Waberski et al., 2019). No entanto, apesar dos avanços
18 proporcionados por essa biotecnologia, a criopreservação do sêmen nesta
19 espécie ainda representa um desafio significativo, correspondendo a apenas 1%
20 das inseminações artificiais realizadas no mundo, evidenciando a necessidade
21 de novos avanços para ampliar sua aplicação (Guthrie e Welch, 2005; Yeste,
22 2015; Waberski, et al., 2019; Roca et al., 2011; Johnson et al., 2000).

23 Embora eficiente, a criopreservação dos espermatozoides pode causar
24 diversos danos, principalmente devido ao choque térmico e ao aumento das
25 espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chatterjee e Gagnon, 2001; Guthrie e
26 Welch, 2005; Fraser e Strzeżek, 2007; Rosato e Iaffaldano, 2013). No entanto, é
27 amplamente reconhecido que diferentes espécies respondem de maneira
28 variável à criopreservação de sêmen (Holt, 2000; Zalazar et al., 2016). Essa
29 variabilidade está fortemente associada à composição do plasma seminal,
30 especialmente à presença de proteínas específicas.

31 Composto principalmente por proteínas, o plasma seminal é um
32 componente essencial do ejaculado e desempenha funções cruciais na

33 fertilidade animal (Katila et al., 2006; Mann et al., 2012). No entanto, seu papel
34 na criopreservação ainda continua sendo amplamente discutido. Nesse
35 contexto, diversos estudos têm investigado o papel dessas proteínas na
36 proteção espermática durante o congelamento e descongelamento, além de
37 explorar alternativas para aprimorar o processo (Manjunath et al., 2007;
38 Caballero et al., 2012; Holt et al., 2015; Zalazar et al., 2020). Entre as estratégias
39 emergentes, destaca-se o uso de proteínas recombinantes, que podem ser
40 adicionadas ao sêmen antes ou após o congelamento com o objetivo de
41 aumentar a resistência dos espermatozoides ao estresse criogênico e, assim,
42 melhorar a viabilidade pós-descongelamento (Qi et al., 2020; Heng et al., 2022).

43 Essa abordagem tem ganhado atenção nos últimos anos, visando
44 melhorar o processo de criopreservação (Ledesma et al., 2019; Zalazar et al.,
45 2016; 2019). A produção de proteínas recombinantes envolve a inserção de
46 sequências de DNA em vetores de expressão, os quais são posteriormente
47 introduzidos em um hospedeiro, possibilitando assim a síntese heteróloga das
48 proteínas de interesse em ambiente controlado (Wurm & Bernard, 1999).

49 Neste contexto, buscou-se estabelecer um método viável para a produção de
50 proteínas recombinantes do plasma seminal bovino, espécie utilizada como
51 modelo experimental, em razão dos protocolos de criopreservação amplamente
52 estabelecidos e dos dados proteômicos robustos previamente gerados pelo
53 nosso grupo (Rego et al., 2016; Gomes et al., 2020; Viana et al., 2025). As
54 proteínas de interesse foram selecionadas de acordo com sua funcionalidade,
55 associação com marcadores de fertilidade e criopreservação, sendo elas: *binder*
56 *of sperm protein 5* (BSP5), osteopontina (OPN), e espermadesina (SPAD1).
57 Assim, o objetivo deste trabalho foi clonar as proteínas alvo em diferentes cepas
58 da bactéria *Escherichia coli* utilizando o vetor de expressão pET-28a(+), para a
59 expressão e purificação eficiente das proteínas recombinantes de interesse. A
60 produção dessas proteínas recombinantes visa, futuramente, possibilitar sua
61 adição em meios diluidores já utilizados na criopreservação de sêmen de
62 espécies com baixa criotolerância, como suínos.

63 Esperamos que, ao serem adicionadas aos meios, essas proteínas
64 contribuam na proteção e estabilidade dos espermatozoides durante o processo
65 de congelamento e descongelamento, auxiliando na integridade espermática, e
66 consequentemente, melhorar os índices de fertilidade, representando um grande

67 potencial para o avanço reprodutivo, especialmente em espécies que ainda
68 possuem limitações.

69

70 **2 REVISÃO DE LITERATURA**

71 **2.1 Sêmen e plasma seminal**

72

73 O sêmen é um fluido constituído por espermatozoides, que são produzidos
74 pelos testículos, e fluidos secretados de glândulas acessórias (Rodriguez-
75 Martinez et al., 2011; Juyena et al., 2012). Os espermatozoides são células
76 altamente especializadas para transportar o material genético ao longo de todo
77 trato reprodutivo feminino até o local de fertilização, na tuba uterina, e fertilizar o
78 oócito. Para que este processo ocorra é necessário que estes estejam sem
79 defeitos morfológicos e que possuam as membranas plasmáticas e acrossômica
80 íntegras (Feugang et al., 2010; De Assumpção et al., 2013; Moura e Memili,
81 2018).

82 O plasma seminal, por sua vez, é produzido e secretado pelas glândulas
83 sexuais acessórias, testículo e epidídimo (Katila et al., 2006; Mann et al., 2012;
84 Manjunath et al., 2002; Kareskoski and Katila, 2008; Barth et al., 1989). Trata-se
85 de uma mistura complexa, composta por uma série de substâncias, como
86 antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, aminoácidos, lipídios, hormônios
87 esteroides, além de microelementos como Se, Zn, Cu e Fe, e rico em proteínas,
88 que juntos compõem um fluido isotônico com importante papel (Tvrdá et al.,
89 2013; Katila et al., 2006; Soleilhavoup et al., 2014). Dentre as funções do plasma
90 seminal, destacam-se sua atuação como veículo e suporte energético para os
91 espermatozoides, sua ação antimicrobiana, além da modulação da capacitação
92 espermática e de eventos cruciais para a fertilização (Katila et al., 2006; Mann et
93 al., 2012; Rodriguez-Martinez, 2010; Mann et al., 1981a).

94 O plasma seminal entra em contato com o espermatozoide no momento na
95 ejaculação, promovendo ativação dos gametas em um processo denominado
96 capacitação espermática (Katila et al., 2006; Mann et al., 2012; Manjunath et al.,
97 2002; Ledesma et al., 2014). A maturação e armazenamento dos
98 espermatozoides ocorre no epidídimo, os quais ficam quiescentes até o
99 momento da ejaculação onde serão mesclados ao plasma seminal, para
100 posterior fecundação (Mann et al., 1981b). Neste contexto, o plasma seminal é

101 altamente valioso, pois fornece aporte para os eventos de capacitação
102 espermática e conseqüentemente a fecundação (Mortarino et al., 1998;
103 Manjunath et al., 2002; Ledesma et al., 2014).

104 Um componente fundamental do plasma seminal são proteínas, exercendo
105 funções essenciais na manutenção da integridade e funcionalidade dos
106 espermatozoides, conferindo proteção contra o estresse oxidativo, regulando o
107 metabolismo celular e facilitando processos como a capacitação e a
108 estabilização da membrana espermática (Rodriguez-Villamil et al., 2016; Rego et
109 al., 2014). Desta forma, técnicas que possam trazer avanços neste campo se
110 fazem necessárias, como o uso de proteínas recombinantes (Wurm & Bernard,
111 1999).

112 **2.2 Principais proteínas do plasma seminal**

113
114 As proteínas são macromoléculas orgânicas produzidas por todos os seres
115 vivos, atuando nas mais variadas funções e processos, como em respostas
116 imunes, sinalização celular e transporte molecular (Juyena e Stelletta, 2012;
117 Demain et al., 2009; Rego et al., 2014). Na reprodução, elas influenciam
118 diretamente a fertilidade animal, desempenhando um papel fundamental na
119 proteção dos espermatozoides, no metabolismo e na capacitação e estabilização
120 de membrana (Rego et al., 2014; De Lazari et al., 2019; Kumar et al., 2012).
121 Portanto, a identificação de proteínas com alto potencial de proteção e
122 preservação dos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento
123 pode contribuir significativamente para a melhoria e eficiência da
124 criopreservação (De Lazari et al., 2019).

125 Viana et al. (2018) identificou pela primeira vez 1.159 proteínas no plasma
126 seminal de touros, das quais 79 apresentaram expressão diferencial entre
127 animais de alta e baixa fertilidade. Além disso, o grupo também publicou uma
128 revisão sistemática e uma meta-análise que compilaram três décadas de
129 evidências científicas sobre os efeitos das proteínas do plasma seminal bovino
130 (Viana et al., 2021; Viana et al., 2022). Entre as proteínas apontadas como
131 potenciais biomarcadores de alta fertilidade destacam-se a espermedesina
132 (SPAD), *binder of sperm protein* de 30 kDa (BSP5) e a osteopontina (OPN),
133 todas associadas a uma maior capacidade de congelabilidade do sêmen bovino
134 (Viana et al., 2018).

135 A SPAD1 é uma proteína pertencente à família das Espermedesinas,
136 presente de forma abundante no plasma seminal de mamíferos (Bergeron et al.,
137 2005). Nos suínos são as proteínas mais abundantes no plasma seminal
138 (Bergeron et al., 2005), enquanto nos bovinos ocupam a segunda posição em
139 abundância (Codognoto et al., 2018). Estas desempenham variadas funções
140 como a capacidade de inibir o estresse oxidativo, reduzir a peroxidação lipídica
141 dos espermatozoides, prevenir a reação acrossômica prematura e se ligar a
142 diferentes moléculas, como carboidratos, fosfolipídios e glicosaminoglicanos
143 sulfatados (Topfer-Petersen et al., 1998; Kraus et al., 2005). Composta por cinco
144 membros na espécie suína, AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II, as SPADs
145 possuem uma massa molecular entre 12 a 16 kDa e apresentam uma arquitetura
146 única de domínio CUB, a qual possibilita a ligação entre proteína e
147 espermatozoide, promovendo assim proteção e estabilidade de membrana, além
148 de ter ação na capacitação espermática (Caballero et al. 2008; De Lazari et al.,
149 2019; Pérez-Patiño et al., 2018; Bork e Beckman, 1993).

150 A BSP5 é uma proteína da família das *Binder of Sperm Proteins* (BSP),
151 desempenhando funções importantes como a estabilização da membrana
152 espermática, prevenindo danos estruturais, e a interação com fatores
153 capacitantes, cuja dinâmica varia entre as diferentes espécies (Plante e
154 Manjunath, 2015; Plante et al., 2016). Essas proteínas possuem peso molecular
155 entre 20 e 25 kDa, com variações de acordo com a espécie e o grau de
156 glicosilação (Manjunath et al., 2002). Elas correspondem a cerca de 60% das
157 proteínas totais do plasma seminal de bovinos (Manjunath e Therien, 2002;
158 Moura et al., 2007). Em suínos, embora proteínas semelhantes às BSPs, como
159 as AWN, PSP-I e PSP-II, também estejam presentes no plasma seminal, elas
160 são encontradas em menor proporção quando comparadas aos bovinos,
161 refletindo as particularidades da fisiologia reprodutiva de cada espécie (Calvete
162 et al., 1997).

163 Essas proteínas são secretadas pelas glândulas sexuais acessórias
164 masculinas e, durante a ejaculação, são liberadas no plasma seminal, onde se
165 ligam à membrana dos espermatozoides, influenciando processos como
166 proteção, capacitação e interação com o oócito (Souza et al., 2008; Manjunath
167 et al., 2002). As BSP's possuem dois domínios do tipo fibronectina II (Fn2),
168 responsáveis por conferir a capacidade de ligação a fosfolipídios e

169 glicoconjugados presentes na membrana plasmática dos espermatozoides
170 (Manjunath et al., 2007). Além disso, essas proteínas conferem estabilidade à
171 membrana espermática, regulando a remoção de colesterol e fosfolipídeos, o
172 que auxilia na capacitação e modula a interação com o oócito durante a
173 fertilização (Plante & Manjunath, 2015; Plante et al., 2016).

174 A OPN é uma glicoproteína ácida multifuncional pertencente à família das
175 SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins*) (Denhardt,
176 2004). Originalmente identificada na matriz óssea mineralizada de bovinos
177 (Franzen & Heinegard, 1985), a OPN apresenta diversas modificações pós-
178 traducionais, como glicosilação, fosforilação e sulfatação, que influenciam sua
179 estrutura e função (Denhardt & Guo, 1993; Hunter, 2013; Rittling et al., 2004).
180 Além disso, essas proteínas destacam-se por sua versatilidade funcional,
181 estando envolvidas em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo
182 remodelação tecidual e extracelular, modulação da resposta imune e mediação
183 da adesão celular (Bouleftour et al., 2016).

184 Sua expressão é observada em vários tecidos do trato reprodutor
185 masculino, como nas células epiteliais das ampolas e das glândulas vesiculares,
186 em espermátides alongadas nos testículos, além de estar presente no epidídimo
187 e em espermatozoides epididimários (Siiteri et al., 1995; Erikson et al., 2007).
188 Recentemente, diferentes padrões de fosforilação da OPN de plasma seminal
189 bovino foram descritos, sugerindo que esta proteína define diferentes funções na
190 fisiologia espermática (Gomes et al., 2020).

191 Embora essas proteínas desempenhem um papel fundamental na
192 criopreservação do sêmen, a identificação de biomarcadores com aplicabilidade
193 universal ainda representa um desafio significativo. Deste modo, o uso de
194 proteínas recombinantes se torna uma alternativa promissora, com potencial
195 para impulsionar avanços relevantes na área (Wurm & Bernard, 1999).

196 **2.3 Papel das proteínas na criopreservação**

197 O congelamento de sêmen é uma técnica amplamente aplicada na
198 reprodução de animais como os bovinos (Lee & Kim, 2018), mas ainda apresenta
199 desafios associados à criotolerância de espermatozoides em algumas espécies
200 domésticas. Entre suas principais vantagens, destacam-se o armazenamento de
201 material genético a longo prazo, o controle sanitário dos plantéis, uso de

202 tecnologias como a pré-seleção de sexo e o suporte à conservação da
203 diversidade genética por meio de bancos de germoplasma (Johson et al., 2005;
204 Bailey et al., 2008).

205 Apesar desses benefícios, o processo de criopreservação pode causar
206 danos estruturais e funcionais aos espermatozoides, comprometendo
207 parâmetros importantes como motilidade, integridade de membrana e
208 viabilidade, prejudicando a viabilidade espermática após o descongelamento
209 (Chatterjee e Gagnon, 2001; Guthrie e Welch, 2005; Fraser e Strzeżek, 2007;
210 Rosato e Iaffaldano, 2013; Lee e Kim, 2018). Nesse contexto, as proteínas
211 presentes no plasma seminal desempenham um papel fundamental na proteção
212 espermática contra os danos provocados pelas variações de temperatura no
213 congelamento (Gomes et al., 2020). Como principais mecanismos de proteção,
214 destacam-se a estabilização da membrana plasmática, a ação antioxidante e a
215 regulação da capacitação espermática.

216 Durante a criopreservação, a membrana plasmática dos espermatozoides
217 perde fluidez, levando à reorganização dos fosfolípidos e comprometendo sua
218 estabilidade estrutural (Ugur et al., 2019; Lemma, 2011). Nessa fase, proteínas
219 específicas se ligam à membrana espermática, promovendo sua estabilização e
220 prevenindo alterações mais graves, como o aumento da permeabilidade, a perda
221 da integridade mitocondrial e danos ao DNA (Lemma, 2011; Grötter et al., 2019).

222 Quando a membrana mitocondrial perde sua integridade e fluidez, ocorre
223 um aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando
224 em estresse oxidativo. Para mitigar esses efeitos, diversas proteínas do plasma
225 seminal atuam como enzimas antioxidantes, reduzindo a ação das ROS e,
226 conseqüentemente, minimizando o estresse oxidativo, ao mesmo tempo em que
227 contribuem para a manutenção da integridade do DNA (Catalán et al., 2022; Pillai
228 et al., 2017; Potts et al., 2000).

229 Além disso, a capacitação espermática precoce é outro efeito prejudicial da
230 criopreservação que compromete a funcionalidade dos espermatozoides.
231 Algumas proteínas do plasma seminal ajudam a prevenir esse problema,
232 regulando, por exemplo, os níveis intracelulares de Ca^{2+} . Elas evitam que esses
233 níveis se elevem de forma descontrolada durante o congelamento,
234 demonstrando um efeito decapacitante (Pillai et al., 2017; Zalazar et al., 2020).

235 As proteínas do plasma seminal exercem um papel essencial na proteção
236 e manutenção da qualidade espermática durante a criopreservação,
237 minimizando os danos causados pelo congelamento e descongelamento. Assim,
238 o estudo dessas proteínas e a possibilidade de produzi-las por métodos
239 recombinantes são fundamentais para o avanço das biotecnologias na
240 reprodução.

241 **2.4 Proteínas recombinantes**

242
243 A produção de proteínas por meio da expressão heteróloga, utilizando um
244 vetor e uma cepa hospedeira, caracteriza essas macromoléculas como proteínas
245 recombinantes (Wurm & Bernard, 1999; Rosano et al., 2014). Estas, são
246 produzidas através da engenharia genética, expressando diferentes proteínas
247 por meio de bactérias, fungos, plantas, leveduras ou células de mamíferos
248 (Demain et al., 2009; Wurm & Bernard, 1999). Isso foi possível através de
249 estudos que levaram a descoberta do DNA recombinante, documentado em
250 meados da década de 70 (Grife et al., 2017; Ferrer-Miralles et al., 2009). Em
251 1977 foi relatado a primeira produção funcional de proteína recombinantes, por
252 meio da bactéria *E. coli*, abrindo as portas para posteriores estudos (Grife et al.,
253 2017; Itakuna et al., 1977).

254 Na produção de proteínas recombinantes, a bactéria *Escherichia coli* foi um
255 dos primeiros hospedeiros utilizados e permanece como uma das principais
256 escolhas (Terpe, 2006; Demain et al., 2009; Fakruddin et al, 2013; Grife et al.,
257 2017; Ferrer-Miralles et al., 2009). *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa
258 em forma de bastonete, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que se
259 destaca por sua resistência e capacidade de adaptação, sendo capaz de crescer
260 em ambientes aeróbicos e anaeróbicos (Elbing et al., 2019; Tuttle et al., 2021).
261 Seu crescimento ideal ocorre a 37 °C em pH neutro, sob condições de aerobiose
262 sendo capaz de se duplicar em apenas cerca de 20 minutos (Tuttle et al., 2021;
263 Hayat et al., 2018; Rosano et al., 2019).

264 A ampla utilização de *E. coli* deve-se a diversas vantagens, como rápida taxa
265 de crescimento e expressão de proteínas, alta capacidade de formar grandes
266 quantidades de colônias, adaptação a diferentes meios e temperaturas, além do
267 custo-benefício, tornando-a uma escolha eficiente para a produção em larga
268 escala (Demain et al., 2009; Grife et al., 2017; Tuttle et al., 2021; Freigassner et

269 al., 2009). *Escherichia coli* é capaz de produzir proteínas complexas em grandes
270 quantidades, podendo acumular até 80% de seu peso seco (Demain et al., 2009;
271 Choi & Lee, 2004). Devido a protocolos padronizados bem definidos para seu
272 cultivo, a reprodutibilidade é facilitada, servindo de suporte para diversas
273 pesquisas (Tuttle et al., 2021; Gupta et al., 2016).

274 Diferentes cepas de *E. coli* são amplamente utilizadas como hospedeiras na
275 clonagem de vetores de expressão devido a versatilidade e eficiência (Chart et
276 al., 2000; Rosano et al., 2014). Dentre a ampla variedade, destacam-se a BL21
277 e a DH5 α (Tuttle et al., 2021; Terpe et al., 2006). A BL21 se tornou a cepa
278 preferencial para a expressão de proteínas recombinantes devido à presença do
279 gene da polimerase T7, que permite um alongamento das cadeias cerca de cinco
280 vezes mais rápido (Sørensen et al., 2005; Choi et al., 2010; Tuttle et al., 2021;
281 Terpe et al., 2006; Bower et al., 2009; Rosano et al., 2019). Já a DH5 α é
282 amplamente utilizada para clonagem e replicação de plasmídeos, sendo capaz
283 de amplificar o DNA plasmidial de forma rápida e eficiente (Kostylev et al., 2015;
284 Tuttle et al., 2021). Outra cepa importante para expressão proteica é a Arctic
285 Express, que expressa constitutivamente duas chaperonas, fornecendo suporte
286 ao dobramento eficiente das proteínas, especialmente em baixas temperaturas
287 (Belval et al., 2015). A SHuffle se destaca por permitir a expressão de proteínas
288 que formam ligações dissulfeto, fornecendo um ambiente citoplasmático que
289 favorece a formação dessas ligações e auxílio no correto dobramento das
290 proteínas (Hayat et al., 2018).

291 Os plasmídeos por sua vez, são pequenas moléculas compostas por DNA
292 circular de fita dupla, independente do cromossomo e com replicação autônoma
293 (Wei, 2024; Al Doghaither et al., 2019). Estes podem ser de diferentes tipos,
294 sendo o principal baseado em DNA, que são utilizados para clonagem e
295 expressão em bactérias, além de vetores virais e de RNA de interferência (RNAi)
296 (Silva et al., 2012; Abuzeid et al., 2011). Essas características tornam os
297 plasmídeos ferramentas versáteis na engenharia genética, pois podem ser
298 facilmente modificados (Lopes et al., 2014). Além disso, eles apresentam
299 vantagens significativas: são estáveis, seguros, permitem o armazenamento em
300 temperatura ambiente, o que facilita sua comercialização e disseminação, e
301 podem conferir resistência a antibióticos específicos (Lopes et al., 2014).

302 No presente trabalho, foi utilizado o vetor de expressão pET-28a(+),
303 pertencente à família de plasmídeos pET, que se destaca como primeira opção
304 para clonagem e expressão de proteínas recombinantes (Li et al., 2022). Este
305 vetor possui T7 promotor, sendo reconhecido assim pela RNA polimerase T7 e
306 indução pela molécula de IPTG (Choi et al., 2010). Além disso, o vetor pET-
307 28a(+) possui uma sequência que codifica His-tag, facilitando a purificação das
308 proteínas expressas por cromatografia de afinidade (Li et al., 2022; Huleani et
309 al., 2022).

310 **2.5 Aplicação de proteínas recombinantes na criopreservação animal**

311 Proteínas recombinantes têm sido amplamente utilizadas em pesquisas
312 sobre a criopreservação de sêmen em várias espécies animais, mostrando
313 resultados promissores. Em um estudo com búfalos, Pillai et al. (2017)
314 observaram que a adição da regucalcina (RGN) a um diluidor à base de Tris-egg
315 yolk-based durante o congelamento resultou em melhorias significativas na
316 motilidade progressiva pós-descongelamento, na integridade acrossomal e na
317 capacidade de ligação à zona pelúcida dos espermatozoides. De forma similar,
318 Zalazar et al. (2020) demonstraram que a adição de SPINK3 ao sêmen de
319 carneiro após o descongelamento levou a uma melhora significativa na
320 viabilidade, motilidade e status mitocondrial. Além disso, essa proteína reduziu
321 a peroxidação lipídica e aprimorou a capacidade de fertilização.

322 Em bovinos, Holt et al. (2015) demonstraram que a proteína recombinante
323 HSPA8 foi capaz de proteger espermatozoides de touros durante a
324 criopreservação. Em concentrações adequadas, essa proteína melhorou a
325 integridade da membrana plasmática e a viabilidade pós-descongelamento, com
326 benefícios mais evidentes em raças de corte. Além disso, essa proteína também
327 auxiliou na redução significativa dos efeitos apoptóticos em espermatozoides de
328 raças de corte.

329 Adicionalmente, pesquisas com sêmen de galo por Heng et al. (2022)
330 demonstraram que a adição de 0,5 µg/mL de RhoA recombinante ao fluido
331 crioprotetor melhorou significativamente a motilidade, taxa de sobrevivência,
332 linearidade, velocidade em linha reta e integridade acrossomal dos
333 espermatozoides após o processo de congelamento/descongelamento. Análises
334 moleculares também confirmaram que a proteína recombinante foi capaz de

335 reduzir danos estruturais à membrana plasmática, membrana nuclear e à cauda
336 dos espermatozoides.

337 Além dos trabalhos citados, outros estudos com proteínas recombinantes
338 já foram conduzidos com carneiros (Ledesma et al., 2021; Zalazar et al., 2016;
339 Ledesma et al., 2019), bovinos (Alvarez-Gallardo et al., 2013) e búfalos (Qadeer
340 et al., 2016). Apesar dos avanços, ainda existem desafios para a aplicação dessa
341 tecnologia em condições reais de campo, padronização dos protocolos de
342 dosagem, métodos, estabilidade das proteínas durante o processo de
343 congelamento e o custo-benefício da implementação em larga escala (Hussain
344 et al., 2014; Hussain et al., 2017; Bhatwa et al., 2021; De Brabander et al., 2023).

345 Ainda assim, o uso dessas proteínas oferece vantagens importantes,
346 como a redução dos danos causados pelas variações de temperatura, a
347 preservação da qualidade dos espermatozoides e o favorecimento de uma maior
348 fertilidade pós-descongelamento (Lemma, 2011; Alvarez-Gallardo et al., 2013;
349 Pillai et al., 2017). Nesse contexto, considerando os desafios que ainda
350 persistem na criopreservação do sêmen bovino e de outras espécies de
351 interesse zootécnico, como suínos, as proteínas recombinantes se destacam
352 como uma ferramenta promissora, com aplicações práticas relevantes e grande
353 potencial para melhorar os índices reprodutivos em sistemas de produção
354 animal.

355 3 OBJETIVOS

356 3.1 Objetivo geral

357 Clonar, expressar e purificar proteínas do plasma seminal de bovinos com
358 potencial uso na criopreservação de sêmen de animais com baixa criotolerância.

359 3.2 Objetivos específicos

- 360 ● Recuperar as sequências de aminoácidos das proteínas de interesse
361 do plasma seminal bovino a partir de bancos de dados (UniProt);
- 362 ● Clonar as proteínas BSP5, OPN e SPAD1, associadas à fertilidade e
363 com potencial aplicação na criopreservação de sêmen;
- 364 ● Expressar as proteínas BSP5, SPAD1 E OPN em *Escherichia coli*
365 utilizando o vetor plasmidial pET-28a(+);
- 366 ● Purificar as proteínas BSP5, SPAD1 e OPN.

367 4 MATERIAIS E MÉTODOS

368 4.1 Considerações éticas

369 O presente estudo foi realizado em conformidade com as normas de
370 conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do Departamento
371 de Medicina Veterinária DVT/UFV, mediante a aprovação da Comissão de Ética
372 no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/ UFV), processo
373 n° 25/2020.

374

375 4.2 Local do experimento

376 O estudo foi conduzido no Laboratórios de Biotecnologia Molecular e
377 Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa –
378 MG.

379

380 4.3 Clonagem

381 Inicialmente, as sequências de aminoácidos das proteínas BSP5, OPN, e
382 SPAD1 foram recuperadas do Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Para cada
383 proteína um BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?-PAGE=Proteins>)
384 foi realizado para verificar a similaridade com sequências proteicas da espécie
385 de interesse, considerando a aplicação dessas proteínas para criopreservação
386 de sêmen na espécie suína.

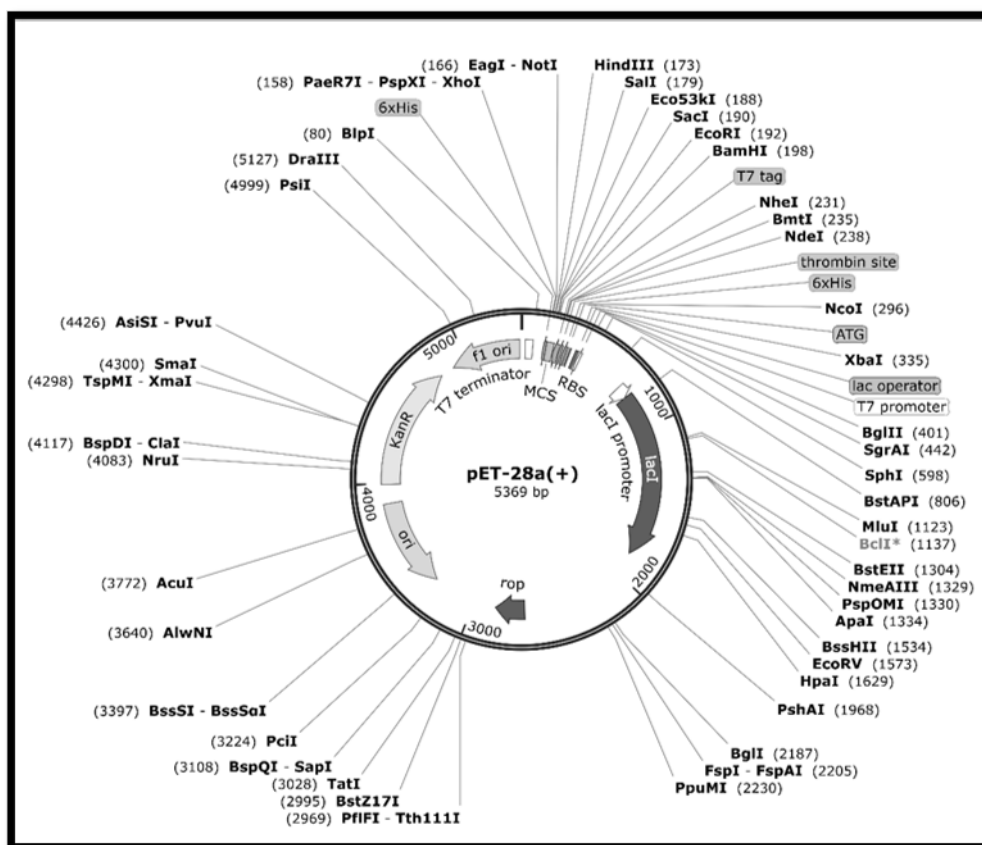
387 As sequências de aminoácidos das três proteínas foram analisadas
388 utilizando o programa SignalP
389 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) para prever a presença
390 de peptídeo sinal, e o TMHMM ([https://services.healthtech.dtu.dk/services-
391 /TMHMM-2.0/](https://services.healthtech.dtu.dk/services-TMHMM-2.0/)) para identificar a presença de alças transmembrana. As
392 sequências gênicas de cada uma das proteínas foram clonadas no vetor pET28a
393 (Fig. 1), o qual possibilita a expressão em *Escherichia coli*. As inserções de cada
394 gene foram realizadas entre os sítios de restrição das enzimas NheI e XhoI, de
395 modo a garantir a expressão intracelular das proteínas-alvo com uma cauda de
396 histidina (6xHis) na região N-terminal. A confirmação da inserção correta das
397 sequências no vetor foi realizada por meio de ferramentas bioinformáticas,
398 assegurando a integridade e a precisão da sequência clonada.

399 As sequências gênicas das proteínas-alvo a serem clonadas foram geradas
 400 utilizando a ferramenta IDT Codon Optimization Tool (<https://www.idtdna.com/->
 401 [CodonOpt](https://www.idtdna.com/-CodonOpt)), que realiza a otimização dos códons visando a máxima eficiência de
 402 expressão em *E. coli*. Essa ferramenta ajusta os códons de cada aminoácido
 403 para aqueles mais frequentemente utilizados por *E. coli*, garantindo uma
 404 tradução mais eficaz e uma maior produção das proteínas recombinantes.

405 Após a geração dos genes, as sequências foram submetidas à análise no
 406 NEBcutter (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/prj/>) para verificar a presença de
 407 sítios de restrição. Esse passo foi essencial para assegurar que os genes
 408 projetados não contivessem sítios de restrição correspondentes às enzimas
 409 selecionadas para a clonagem, garantindo, assim, a integridade das sequências
 410 e o sucesso do processo de clonagem.

411

412 **Figura 1.** Representação do mapa circular do vetor de expressão pET-28a(+). Fonte: SnapGene.



413

414

415 Como última validação, as sequências gênicas das proteínas recombinantes
 416 a serem clonadas foram validadas através de tradução *in silico* e alinhamento
 417 com as proteínas nativas. As ferramentas Translate Tool

418 (<https://web.expasy.org/translate/>) e Clustal Omega
 419 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) foram utilizadas para comparar as
 420 sequências originais com as recombinantes, garantindo que não houve
 421 alterações prejudiciais nas sequências proteicas.

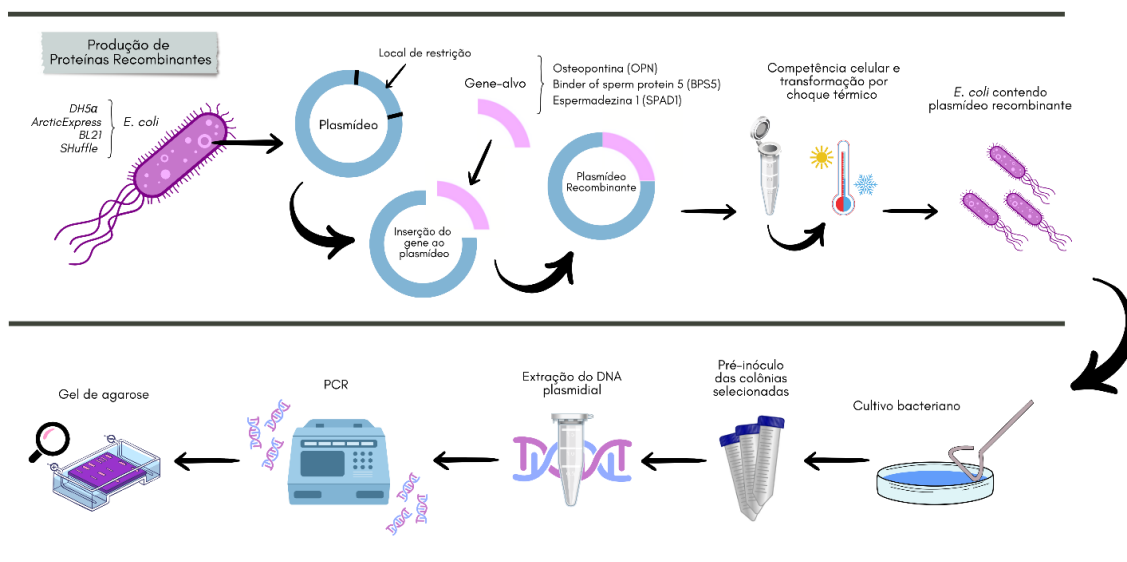
422

423 4.3.1 Confirmação das clonagens

424 Os clones biossintéticos das proteínas alvos pET28a/OPN,
 425 pET28a/SPAD1 e pET28a/BSP5 foram inseridos na cepa de *E. coli* DH5 α por
 426 transformação por choque térmico (Fig. 2).

427

428 **Figura 2.** Esquema ilustrativo da metodologia empregada para a produção e purificação das
 429 proteínas recombinantes. O diagrama resume as etapas de clonagem gênica até a confirmação
 430 das clonagens por PCR.



431

432

433 4.3.2 Transformação por choque térmico

434 As transformações bacterianas foram realizadas utilizando alíquotas de
 435 100 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α previamente preparadas. Após
 436 a retirada do ultrafreezer, 100 ng de DNA plasmidial de cada proteína foram
 437 adicionados às células. As amostras foram mantidas em banho de gelo por 30
 438 min, seguidas de choque térmico em banho-maria a 42 $^{\circ}$ C por 45 s. Em seguida,
 439 as células foram imediatamente retornadas ao banho de gelo por 2 min.

440 Posteriormente, as células foram suspensas em 1 mL de meio LB sem
 441 antibiótico e incubadas sob agitação a 180 rpm, a 37 $^{\circ}$ C, por 2 h para

442 recuperação. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por
443 5 min. O sobrenadante foi descartado, deixando um volume residual de 100 µL,
444 que foi utilizado para ressuspender o pellet celular.

445 Esse volume foi então utilizado para plaqueamento em placas de LB-ágar
446 contendo o antibiótico de seleção canamicina (50 mg/mL), utilizando uma alça
447 de Drigalski. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h para permitir o
448 crescimento das colônias. Os clones transformantes contendo os plasmídeos
449 pET28a/OPN, pET28a/SPAD1 e pET28a/BSP5 foram selecionados com base
450 na resistência à canamicina, e a extração do DNA plasmidial foi realizada
451 utilizando o protocolo manual de miniprepi.

452

453 **4.3.3 Extração manual de DNA plasmidial**

454 Para o procedimento de extração de DNA plasmidial por miniprepi, 5 mL
455 de cada cultura bacteriana contendo o DNA das proteínas-alvo, derivada da
456 ativação em meio LB das colônias isoladas e selecionadas durante as
457 transformações, foram centrifugados a 10.000 rpm por 2 min. O pellet celular
458 resultante foi ressuspendido em 200 µL da solução 1 (Tris HCL 1M, pH 8; EDTA
459 0,5 pH 8; glicose 500 mM; água destilada) e 5 µL de RNase (10 mg/mL, 10%
460 v/v), com incubação por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL da
461 solução 2 (água destilada; NaOH 2M; SDS 10%) foram adicionados à
462 suspensão, que foi misturada suavemente por inversão e incubada por 5 min no
463 gelo. Após esse período, foram adicionados 200 µL da solução 3 (Acetato de
464 potássio 5 M, pH 5,5; ácido acético; água destilada) e a mistura foi centrifugada
465 a 10.000 rpm por 10 minutos.

466 O sobrenadante foi cuidadosamente recolhido para realizar a precipitação
467 do DNA plasmidial com 800 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas a
468 -20 °C por 2 h, seguidas de centrifugação a 10.000 rpm por 15 min. O
469 sobrenadante foi descartado, e o pellet resultante foi lavado com 500 µL de
470 etanol a 70%, seguido de outra centrifugação a 10.000 rpm por 15 min. O pellet
471 de DNA plasmidial foi ressuspendido em 20 µL de água livre de RNase e
472 armazenado a -20 °C. As clonagens e inserção dos DNAs plasmidiais
473 pET28a/OPN, pET28a/SPAD1 e pET28a/BSP5 na cepa de cepa de *E. coli* DH5α
474 foram confirmadas por PCR.

475

476 **4.3.4 PCR**

477 A confirmação da clonagem de pET28a/OPN, pET28a/SPAD1 e
 478 pET28a/BSP5 foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR),
 479 amplificando um fragmento de DNA correspondente a região do promotor T7 do
 480 vetor pET28a, o qual especificamente engloba a região do sítio de clonagem
 481 escolhido para as proteínas alvos, o par de primer é apresentado na Tabela 1. A
 482 descrição da reação de PCR utilizada está detalhada na Tabela 2, enquanto o
 483 programa de ciclos de temperatura, em termociclador, aplicado é apresentado
 484 na Tabela 3. Água foi empregada como controle negativo, e um DNA de uma
 485 outra proteína clonada em pET28a (460 pb) foi utilizado como controle positivo.
 486 Para cada reação de PCR foi utilizado 2 µL de DNA a ser avaliado, em um
 487 volume final de reação de 25 µL por PCR.

488

489 **Tabela 1.** Sequências de primers promotor T7 vetor pET28a.

Primers	Sequência	Amplicon
T7 promotor (<i>forward</i> - F)	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	300 pb (vetor vazio)
T7 terminador (<i>reverse</i> - R)	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	

490

491 **Tabela 2.** Reação padrão utilizada para preparo de PCR.

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

Reagente	Volume (µL)
Tampão Taq DNA polimerase com Mg ²⁺	5,00
dNTPs	1,00
Primer F	1,00
Primer R	1,00
DNA a ser avaliado	2,00
Taq DNA polimerase	0,25
Água nuclease <i>free</i>	39,75
Total	50,00

Tabela 3. Programa de PCR aplicado o par de primer T7.

Etapas	Temperaturas (°C) / Tempo
	T7 F/R

502		Desnaturação	95 / 5 min
503			
504	Ciclos (35)	Desnaturação	95 / 30 s
505		Anelamento	48 / 30 s
506		Extensão	72 / 1 min
507		Extensão final	72 / 7 min

508

509 Os produtos de PCR de cada amostra de DNA testada foram avaliados por
 510 eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmar a presença das bandas
 511 amplificadas específicas para cada clone.

512

513 4.4 Expressão de Proteínas

514 4.4.1 Transformação por choque térmico em cepas de expressão

515 Para realizar a expressão das proteínas recombinantes, o DNA plasmidial
 516 contendo pET28a/OPN, pET28a/SPAD1 e pET28a/BSP5 foi inserido nas cepas
 517 de expressão *E. coli* BL21 DE3, SHuffle® T7 e Arctic Express. Para cada
 518 proteína, foi realizada uma transformação por choque térmico em cada uma
 519 dessas cepas. As transformações seguiram o protocolo descrito no item 4.3.2,
 520 com a modificação de que as cepas selvagens *E. coli* BL21 DE3, SHuffle® T7 e
 521 Arctic Express foram previamente cultivadas em 5 mL de meio LB sem antibiótico
 522 por 16 h a 37 °C, sob agitação a 180 rpm e pré tratadas com CaCl₂. No caso da
 523 cepa Arctic Express, na ativação, foi adicionado gentamicina (35 mg/mL) devido
 524 à sua resistência intrínseca a esse antibiótico.

525 Antes da transformação, as cepas foram submetidas a um pré-tratamento
 526 com CaCl₂ 0,1 M para ativar a competência celular. Para isso, 1 mL de cada
 527 cultura foi centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado,
 528 e o pellet celular foi lavado com CaCl₂ 0,1 M mantido no gelo. Após nova
 529 centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado
 530 novamente, e o pellet foi ressuspendido em 100 µL de CaCl₂ 0,1 M.

531 A seguir, procedeu-se com a transformação por choque térmico das
 532 amostras. As colônias selecionadas foram ativadas em 5 mL meio LB com
 533 canamicina a 50 mg/mL e (16 h, 37 °C e 180 rpm) seguidas de extração do DNA
 534 plasmidial (item 4.3.3) e confirmação da inserção correta dos genes das
 535 proteínas-alvo nas cepas de expressão através de PCR (item 4.3.4).

536

537 4.4.2 Testes de expressão em pequena escala

538 Os testes de expressão foram realizados com as proteínas 6xHis-SPAD1,
539 6xHis-OPN e 6xHis-BSP5, utilizando a cepa *E. coli* Arctic Express. O protocolo
540 inicial de indução envolveu a adição de 1 mM de Isopropil β -D-1-
541 tiogalactopiranosídeo (IPTG), cultivo por 24 h a 12 °C, sob agitação de 180 rpm
542 (Fig. 3).

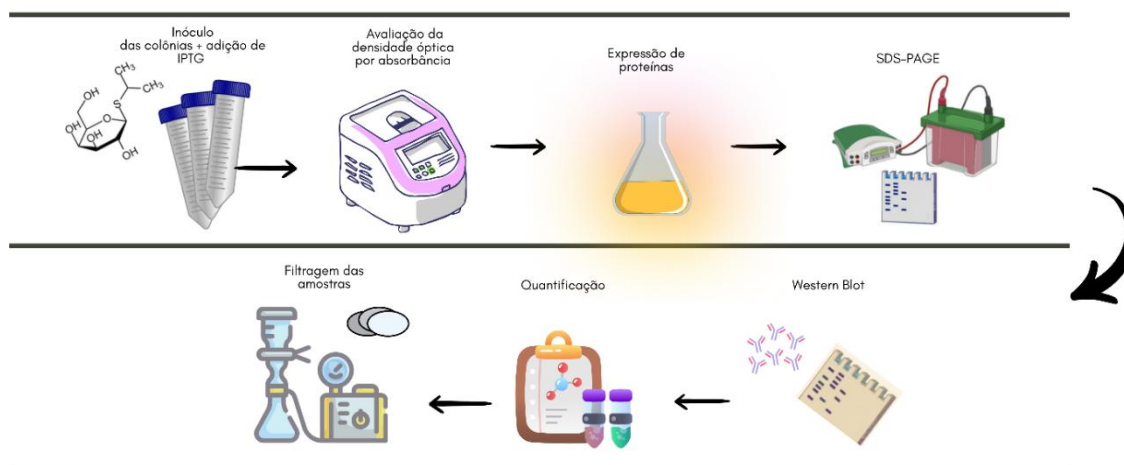
543 Foi feito um pré-inóculo utilizando clones positivos de pET28a/SPAD1,
544 pET28a/OPN e pET28a/BSP5, previamente transformados na cepa *E. coli* Arctic
545 Express. Para isso, foram utilizados 20 μ L de estoque desses clones
546 conservados em glicerol 20% em 5 mL de meio LB, acrescido dos antibióticos
547 de seleção canamicina (50 mg/mL, 2 μ L v/v) e gentamicina (35 mg/mL, 1 μ L v/v).
548 As culturas foram incubadas por 16 h a 37 °C, sob agitação de 180 rpm. Em
549 seguida, 1 mL de cada pré-inóculo foi transferido para 30 mL de meio LB
550 contendo os mesmos antibióticos (canamicina e gentamicina nas mesmas
551 concentrações) e incubado a 30 °C, sob agitação de 180 rpm, até que a
552 densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) atingisse o intervalo de 0,4–0,6. Para induzir
553 a expressão das proteínas, foi adicionado IPTG a uma concentração de 1 mM,
554 e as culturas foram incubadas por 24 h a 12 °C, com agitação de 180 rpm. Após
555 o término do cultivo, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min a 4
556 °C. Os pellets resultantes foram identificados e armazenados a -20 °C para
557 posterior análise.

558 Para a análise da expressão de 6xHis-SPAD1, 6xHis-OPN e 6xHis-BSP5,
559 foi realizada a lise celular das proteínas utilizando tampão PBS, suplementado
560 com 5% de glicerol (v/v), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e 200
561 μ g/mL de lisozima. Para cada 30 mL de cultura induzida, foram utilizados 6 mL
562 do tampão de lise. As amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos,
563 seguidas de ruptura celular por sonicação (amplitude de 100% por 5 minutos,
564 com intervalos de 30 segundos). Após a sonicação, as amostras foram
565 centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fração solúvel (FS),
566 correspondente ao sobrenadante, foi coletada, enquanto o corpo de inclusão
567 (CI), correspondente ao pellet, foi ressuspendido no mesmo volume do tampão
568 de lise, acrescido de 8M de ureia. Tanto as frações FS quanto CI de 6xHis-

569 SPAD1 e 6xHis-BSP5 foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida
 570 a 14%. A confirmação da expressão das proteínas foi realizada por Western
 571 blotting, utilizando anticorpos específicos para a marcação da cauda de 6xHis.

572

573 **Figura 3.** Esquema ilustrativo da metodologia empregada para a produção e purificação das
 574 proteínas recombinantes. O diagrama resume as etapas de indução da expressão de proteínas
 575 recombinantes até a filtragem das amostras.



576
577

578 4.4.3 Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE)

579 A eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida
 580 desnaturante (Laemmli, 1970) foi empregada para avaliar as frações FS e CI da
 581 expressão das proteínas 6xHis-SPAD1, 6xHis-OPN e 6xHis-BSP5. As amostras
 582 (18 μ L) foram fervidas no termociclador por 10 min em tampão de carregamento
 583 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1.0%, glicerol 5.0%, Tris-HCl 62.5 mM,
 584 pH 6.8, e azul de bromofenol 0.05%, e separadas em gel de separação 14% T e
 585 3.0% C, e gel de concentração 5% T e 2.6% C. O sistema de tampão Tris foi
 586 utilizado, com solução de acrilamida/bis 30% T e 3.0% C, e tampão do gel de
 587 separação contendo Tris-HCl 3.0 M, pH 8.45, SDS 0.3%, glicerol 10.7%,
 588 persulfato de amônio 0.033% (p/v) e tetrametiletenodiamina (TEMED) 0.033%.
 589 O tampão de corrida foi composto de Tris 25 mM, glicina 1,9 M, EDTA 10 mM e
 590 SDS 35 mM. A eletroforese foi realizada a 80V por 2 h. Os géis foram corados
 591 com Comassie Brilliant Blue R250 por 30 min, seguido de descoloração em
 592 solução de ácido acético 7.5% e metanol 25%.

593

594 4.4.4 Western blotting

595 Na metodologia de Western blotting para confirmação da expressão das
596 proteínas 6xHis-SPAD1, 6xHis-OPN e 6xHis-BSP5, primeiramente foi feita a
597 corrida eletroforética com 18 µL das frações FS e CI da expressão das proteínas
598 acrescentados de 6 µL de tampão de carregamento. Após a corrida, as proteínas
599 foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare) embebidas
600 em tampão de transferência TG (Glicina 39 mM; Tris 48 mM; Metanol 20%) a
601 400 mA por 1 h, em um sistema semisseco. Após a etapa de transferência, a
602 membrana foi lavada três vezes durante 5 min, cada lavagem com 10 mL de
603 PBS-T 1X (NaH₂PO₄, 0,5 M; Na₂HPO₄, 0,5 M; Água destilada; Tween 20%). A
604 membrana foi então corada em solução de Ponceau.

605 Neste estágio, as bandas de proteínas tornam-se visíveis na membrana,
606 indicando que a transferência das proteínas do gel foi realizada corretamente.
607 Em seguida, a membrana foi incubada em 10 mL de solução de bloqueio
608 contendo PBS-T e 450 mg albumina sérica bovina (BSA) por 1 h, e lavada
609 novamente.

610 A etapa de imunodeteção foi feita com a incubação da membrana, durante
611 1 h, no anticorpo primário anti-HIS produzido em camundongo, diluído na
612 proporção 1:3000 em PBS-T. Posteriormente a membrana foi incubada durante
613 1 h com anticorpo secundário Anti-Mouse IgG, diluído 1:5000 em PBS-T. Após
614 cada incubação com os anticorpos, foram realizadas três lavagens com PBS-T
615 durante 5 min cada uma. Para a revelação das bandas referentes às proteínas,
616 a membrana foi incubada em uma solução com 10 mg do reagente 3,3-
617 diaminobenzidine (DAB) diluído em 10 mL de Tris-HCl 100 mM pH 7,6 com NiCl₂,
618 e adicionado então 10 µl de peróxido de hidrogênio.

619

620 4.5 Expressão de proteínas em larga escala

621 4.5.1 Expressão

622 A expressão em larga escala foi realizada com os clones positivos já
623 transformados das proteínas 6xHis-SPAD1 e 6xHis-BSP5, utilizando a cepa *E.*
624 *coli* Arctic Express. Para esta expressão, foram feitas culturas bacterianas de
625 cada uma das proteínas em meio LB ágar sólido por estria composta, acrescido

626 dos antibióticos de seleção canamicina (50 mg/mL, 2 μ L v/v) e gentamicina (35
627 mg/mL, 1 μ L v/v), e posteriormente incubadas por 24 horas a 37°C.

628 As melhores colônias de cada cultura de SPAD1 e BSP5 (localizadas na
629 fileira maior e mais central da placa), foram selecionadas. Em seguida, utilizando
630 uma alça de estria, essas colônias foram coletadas e transferidas para
631 erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio LB, suplementado com 50 μ L
632 de canamicina e 25 μ L de gentamicina. As culturas foram incubadas por 16 horas
633 a 37 °C, sob agitação de 180 rpm.

634 Posteriormente, 25 mL de cada pré-inóculo foram transferidos
635 separadamente para 1000 mL de meio LB, contendo 2 mL de canamicina e 1 mL
636 de gentamicina. Com os inóculos preparados, foi realizado o monitoramento da
637 densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) da hora 0 e coletamos 25 mL de ambos antes
638 da incubação. As culturas foram incubadas a 30 °C, sob agitação de 180 rpm,
639 até que a DO_{600} atingisse entre 0,4 e 0,6. Com a DO atingida em cada inóculo,
640 foi adicionado 1 mL de IPTG a uma concentração de 1 mM, seguido de
641 incubação por 24 h a 12 °C, com agitação de 180 rpm, para induzir a expressão
642 das proteínas. Após o término do cultivo, as culturas foram centrifugadas a 5000
643 rpm por 20 min a 4 °C. Os pellets resultantes foram identificados em SPAD1 24h
644 e BSP5 24h, ressuspensos com tampão de purificação (15 mL/g) e
645 armazenados a -20 °C para posterior processamento.

646 Para a análise da expressão de 6xHis-SPAD1 e 6xHis-BSP5, foi realizada
647 a lise celular das proteínas utilizando tampão lise (20 mM de imidazol, 500 mM
648 de NaCl e 20 mM de fosfato de sódio dibásico), suplementado com 5% de glicerol
649 (v/v), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e 200 μ g/mL de lisozima.
650 Para cada 30 mL de cultura induzida, foram utilizados 6 mL do tampão de lise.
651 As amostras foram sonicadas com amplitude de 100% por 20 min, com intervalos
652 de 30 s. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por
653 15 min a 4 °C. A fração solúvel (FS), correspondente ao sobrenadante, foi
654 coletada, resultando em 12,5 mL de FS de BSP5 0h e 67,5 mL de FS de BSP5
655 24h, divididos em 4 falcons etiquetados em BSP5 FS 0h, BSP5 FS 1 24h, BSP5
656 FS 2 24h e BSP5 FS 3 24h, enquanto o corpo de inclusão (CI), correspondente
657 ao pellet, foi ressuspensado no mesmo volume do tampão de lise, e no próprio
658 tampão de lise acrescido de 8 M ureia, resultando em 12,5 mL de CI de BSP5
659 0h e 67,5 mL de CI de BSP5 24h, divididos em 4 falcons etiquetados em BSP5

660 CI 0h, BSP5 CI 1 24h, BSP5 CI 2 24h e BSP5 CI 3 24h. Para SPAD1 foi realizado
661 o mesmo processo. A fração solúvel (FS), correspondente ao sobrenadante, foi
662 coletada, resultando em 11 mL de FS de SPAD1 0h e 83 mL de FS de SPAD1
663 24h, divididos em 4 falcons etiquetados em SPAD1 FS 0h, SPAD1 FS 1 24h,
664 SPAD1 FS 2 24h e SPAD1 FS 3 24h, enquanto o corpo de inclusão (CI),
665 correspondente ao pellet, foi ressuspensionado no mesmo volume do tampão de lise
666 acrescido de 8 M ureia, resultando em 11 mL de CI de SPAD1 0h e 83 mL de CI
667 de SPAD1 24h, divididos em 4 falcons etiquetados em SPAD1 CI 0h, SPAD1 CI
668 1 24h, SPAD1 CI 2 24h e SPAD1 CI 3 24h.

669 Tanto as frações FS quanto CI de 6xHis-SPAD1 e 6xHis-BSP5 foram
670 analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%. A confirmação da
671 expressão das proteínas foi realizada por Western blotting, utilizando anticorpos
672 específicos para a marcação da cauda de 6xHis.

673

674 **4.6 Quantificação das proteínas utilizando o método de Bradford**

675

676 A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (Bradford,
677 1976), para determinar a quantidade de proteínas das amostras. Foi utilizado
678 duas microplacas de 96 poços, com triplicata de cada amostra, utilizando a BSA
679 como curva padrão. A absorvância foi medida a 595 nm no leitor de microplaca
680 VERSA max, software SoftMax Pro versão 5.3. O ensaio foi realizado conforme
681 as instruções do fabricante (Bio-Rad, EUA). Os procedimentos foram realizados
682 conforme as instruções fornecidas pelo fabricante (Bio-Rad, EUA).

683 Inicialmente, foi adicionado 10 µl de cada amostra e 190µl de reagente
684 Bradford. O branco da fração solúvel foi o tampão de lise, e do corpo de inclusão
685 o mesmo tampão com ureia, sendo 10 µl de cada. Foram pipetadas as seguintes
686 amostras: branco FS; branco CI; SPAD1: 0h, FS 1, CI 1, FS 2, CI 2, FS 3, CI 3;
687 BSP5: 0h, FS 1, CI 1, FS 2, CI 2, FS 3, CI 3.

688 Depois de pipetadas as amostras, a placa foi envolvida em papel alumínio,
689 e aguardado o tempo de 15 min. Após a primeira leitura da placa, foi observado
690 que todas as amostras de 24 horas estavam muito concentradas, então foi
691 repetido o processo utilizando 8 µl de tampão, 2 µl de amostra e 190 µl de
692 Bradford, realizando uma nova leitura. Na segunda leitura, foi observado que
693 todas as amostras de CI ainda estavam concentradas. Foi repetido o processo,

694 utilizando, 10 µl de amostra (diluída 1:10) e 190 µl de Bradford, entrando todas
695 as amostras na curva.

696

697 **4.6.1 Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) e Western blotting**

698 Foi realizada a eletroforese, conforme descrito no item 4.4.3, para avaliar
699 as frações das amostras da expressão das proteínas em larga escala de 6xHis-
700 SPAD1 (0 h, FS 1, CI 1, FS 2, CI 2, FS 3, CI 3) e 6xHis-BSP5 (0 h, FS 1, CI 1,
701 FS 2, CI 2, FS 3, CI 3), utilizando 24 µL de amostra e 6 µL de tampão de
702 carregamento.

703 Após a eletroforese, foi realizado o Western Blot, seguida da imunodeteccção
704 e revelação, permitindo a identificação das bandas correspondentes às proteínas
705 alvo.

706

707 **4.7 Purificação de Proteínas**

708 **4.7.1 Filtragem das proteínas**

709 Inicialmente foram filtradas todas as amostras de proteínas de CI 24h de
710 SPAD1 e BSP5, por meio de um sistema de filtração a vácuo contendo uma
711 membrana de filtração de 0,22 mm. Para garantir um fluxo adequado durante o
712 processo e minimizar a formação excessiva de espuma, as amostras foram
713 previamente diluídas na proporção de 5:1.

714

715 **4.7.2 Purificação das proteínas por Qubit**

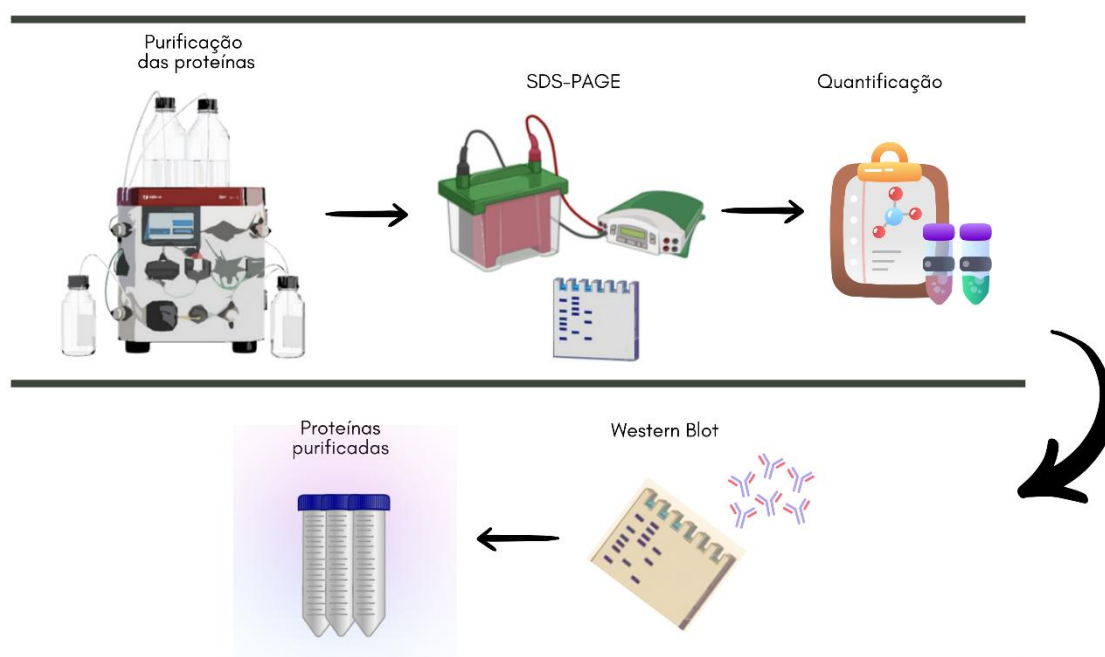
716

717 Para à obtenção das proteínas-alvo isoladas, os extratos de CI
718 provenientes dos cultivos de *E. coli* Arctic Express contendo as proteínas BSP5
719 e SPAD1 foram purificados por cromatografia de afinidade por metal imobilizado
720 (IMAC), utilizando uma coluna de níquel HisTrap™ FF (Sigma-Aldrich) de 5 mL,
721 acoplada ao cromatógrafo ÄKTA Start, sob controle do software UNICORN™
722 (Fig. 4). A coluna foi equilibrada com cinco volumes de tampão de ligação
723 Binding Buffer com ureia (pump A: 8M de ureia, 20mM de imidazol, 500mM de
724 NaCl e 20Mm de fosfato de sódio dibásico) a um fluxo constante de 5 mL/min.
725 Em seguida, as amostras correspondentes foram injetadas na coluna sob o

726 mesmo fluxo. A eluição das proteínas foi realizada mediante aplicação de um
 727 gradiente crescente de concentração do tampão de eluição Elution Buffer com
 728 ureia (pump B: 8M de ureia, 500mM de imidazol, 500mM de NaCl e 20mM de
 729 fosfato de sódio dibásico), em incrementos de 10% a cada etapa, mantendo fluxo
 730 constante de 1 mL/min. As frações eluídas foram coletadas individualmente. As
 731 frações de interesse contendo as proteínas purificadas, foram selecionadas com
 732 base nos perfis cromatográficos obtidos.

733

734 **Figura 4.** Esquema ilustrativo da metodologia empregada para a produção e purificação das
 735 proteínas recombinantes. O diagrama resume as etapas de purificação das proteínas
 736 recombinantes até a obtenção das amostras finais.

737
738

739 4.8 Quantificação das proteínas

740

741 As frações F2 a F16 de SPAD1 e BSP5, após a purificação, foram
 742 quantificadas utilizando o Qubit™ 3.0 Fluorometer, e o kit invitrogen Qubit™
 743 Protein Assay. Foi adicionado 1µl do fluoróforo e 199µl do tampão de proteína.
 744 Todos os tubos foram vortexados. Em seguida, foi retirado 1µl do tubo e
 745 substituído por 1µl de amostra de proteína. Todos os tubos foram vortexados e
 746 incubados por 15 minutos sob proteção da luz. Após o tempo de incubação todos
 747 os tubos foram vortexados e a leitura feita individualmente.

748 Após a quantificação, as frações F7 a F15 da amostra BSP5 foram
749 agrupadas em um único pool, assim como as frações correspondentes a F7 a
750 F15 da amostra SPAD1, seguindo o mesmo protocolo.

751

752 **4.8.1 Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) e Western blotting**

753

754 Foi realizada a eletroforese, conforme descrito no item 4.4.3, para avaliar
755 as frações das amostras de SPAD1 e BSP5, incluindo o controle positivo,
756 proteínas não ligadas, fração de lavagem e frações 6 a 11, utilizando 24 µL de
757 amostra e 6 µL de tampão de carregamento.

758 Após a eletroforese, procedeu-se o Western Blot, imunodeteção e
759 revelação, permitindo a identificação das bandas correspondentes às proteínas
760 alvo.

761

762 **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

763 **5.1 Bioinformática**

764 As análises *in silico* foram essenciais para caracterizar propriedades
765 fundamentais das proteínas BSP5, OPN e SPAD1, com base em suas
766 sequências de aminoácidos. As sequências dessas proteínas foram
767 recuperadas do banco de dados UniProt, sendo utilizadas como ponto de
768 partida para todas as etapas subsequentes de avaliação bioinformática. Essa
769 abordagem permitiu explorar características estruturais e funcionais relevantes
770 para sua produção e aplicação. As sequências recuperadas foram:

771

```
772 >F1MI46_OPN_Bt
773 MERHGGEHLEQPLNSGRSWLSAAGRAGQEGSTEHCISITGDWTL LAAADQGKIITMRIA
774 V ICFCLLGIASALPVKPTSSGSSEEKQLNKNYPDAVATW LKPDPSQKQTF LAPQNSVSSEE
775 TDDNKQNTLPSKSNESPEQTDDLDDDDNSQDVNSNDSDDAETDDDPDHSDESHHSDSD
776 EVDFPTDIPTI AVF TPFIPTESANDGRGDSVAYGLKRSRKKFRRSNVQSPDATEEDFTSH
777 IESEEMHDAPKKTSQLTDHSKETNSSELSKELTPKAKDKNKHSNLIESQENSKLSQEFHS
778 LEDKLDLDHKSEEDKHLKIRISHELDSASSEVN
```

```
779 >P29392_SPAD1_Bt
780 MKLSSVIPWALLLSTATVDSMDWLPRNTNCGGILKEESGVIATYYGPKTNCVWTIQMPPE
781 YHVRVSIQYLQLNCNKESLEIIDGLPGSPVLGKICEGSLMDYRSGSIMTVKYIREPEHP
782 ASFYEVLYFQDPQA
```

```
783 >P81019_BSP5_Bt
784 MAPLVGLFLIWAGASVFQQ LHPVNGGDI PDPGSKPTPPGMADELPTETYDLPPEIYTTTTF
785 LPRTIYPQEEMPYDDKPFPSLLSKANDLNAVFE GPACAFPF TYKGKKYIMCTRKNSVLLW
```

786 CSLDTEYQGNWKFCTERDEPEECVFPFIYRKKSYESCTRVHSEFFWRRWCSLTNSNYDRDKAW
787 KYC

788 A análise de similaridade por BLASTp indicou que as proteínas bovinas
789 BSP5, OPN e SPAD1 possuem similaridade com as sequências presentes na
790 família *Suidae* (Fig. 5, 6 e 7). Esses resultados reforçam o potencial dessas
791 proteínas na interação com componentes do sêmen suíno, justificando sua
792 aplicação na criopreservação dessa espécie. Estudos prévios demonstraram
793 que proteínas do plasma seminal de uma espécie podem interagir
794 funcionalmente com espermatozoides de outra, promovendo efeitos benéficos
795 como o aumento da motilidade progressiva, efeito decapacitante e manutenção
796 da viabilidade (Zalazar et al., 2016; 2020; Ledesma et al., 2019).

797 **Figura 5.** Resultado da análise BLASTp da sequência da proteína OPN (Osteopontina) na família
798 *Suidae* - (taxid:9821)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
secreted phosphoprotein 1 [Sus scrofa]	Sus scrofa	340	340	83%	2e-116	66.78%	303	ABR23529.1
osteopontin isoform X1 [Phacochoerus africanus]	Phacochoerus africanus	338	338	83%	8e-116	66.45%	303	XP_047654000.1
osteopontin isoform X2 [Phacochoerus africanus]	Phacochoerus africanus	334	334	83%	5e-114	66.45%	302	XP_047654001.1
osteopontin precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	333	333	83%	6e-114	65.79%	303	NP_999188.1
osteopontin isoform X2 [Sus scrofa]	Sus scrofa	330	330	83%	2e-112	65.79%	302	XP_005667062.1

799

800

801 **Figura 6.** Resultado da análise BLASTp da sequência da proteína SPAD1 (Espermadesina 1) na
802 família *Suidae* - (taxid:9821)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
major seminal plasma glycoprotein PSP-I precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	140	140	100%	2e-43	54.07%	133	NP_999002.1
major seminal plasma glycoprotein PSP-I [Phacochoerus africanus]	Phacochoerus a...	140	140	100%	4e-43	53.73%	133	XP_047617333.1
carbohydrate-binding protein AWN [Phacochoerus africanus]	Phacochoerus a...	133	133	100%	3e-40	46.27%	154	XP_047617330.1
carbohydrate-binding protein AQN-1 [Phacochoerus africanus]	Phacochoerus a...	132	132	97%	6e-40	49.62%	132	XP_047617334.1
carbohydrate-binding protein AWN precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	132	132	100%	6e-40	47.01%	154	NP_998994.2
carbohydrate-binding protein AQN-1 precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	131	131	97%	1e-39	48.85%	132	NP_001020381.1
carbohydrate-binding protein AQN-3 [Phacochoerus africanus]	Phacochoerus a...	119	119	100%	7e-35	46.27%	137	XP_047617332.1
seminal plasma sperm motility inhibitor precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	119	119	100%	8e-35	46.27%	137	NP_001026946.1
Chain A, MAJOR SEMINAL PLASMA GLYCOPROTEIN PSP-I [Sus scrofa]	Sus scrofa	113	113	78%	8e-33	52.83%	109	1SPP_A
AWN-1=spermadhesin [swine, Peptide_133 aa] [Sus scrofa]	Sus scrofa	108	108	83%	1e-30	42.86%	133	AAB21990.1
RecName: Full=Carbohydrate-binding protein AWN; AltName: Full=Sperm-associated protein AWN; AltName:...	Sus scrofa	108	108	85%	1e-30	42.61%	153	P26776.2
RecName: Full=Seminal plasma sperm motility inhibitor; Flags: Precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	108	108	100%	2e-30	44.03%	137	Q28920.2
AQN-1 protein [Sus scrofa]	Sus scrofa	106	106	76%	3e-30	47.06%	111	CAA06272.1
RecName: Full=Carbohydrate-binding protein AQN-1; AltName: Full=Spermadhesin AQN-1; AltName: Full=Zo...	Sus scrofa	105	105	76%	5e-30	47.06%	111	P26322.1
spermadhesin PSP-II [Sus scrofa]	Sus scrofa	106	106	96%	7e-30	41.86%	137	CAI05906.1
major seminal plasma glycoprotein PSP-II precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	105	105	96%	2e-29	41.09%	137	NP_999001.1
major seminal plasma glycoprotein PSP-II [Phacochoerus africanus]	Phacochoerus a...	105	105	96%	2e-29	41.09%	137	XP_047617331.1
AQN-3=carbohydrate-binding protein [swine, Peptide_116 aa] [Sus scrofa]	Sus scrofa	92.0	92.0	79%	2e-24	43.40%	116	AAB20129.1
RecName: Full=Carbohydrate-binding protein AQN-3; AltName: Full=Spermadhesin AQN-3; AltName: Full=Zo...	Sus scrofa	91.7	91.7	79%	3e-24	43.40%	116	P24020.1

803

804

805 **Figura 7.** Resultado da análise BLASTp da sequência da proteína BSP5 (Binder of Sperm Protein
806 5) na família *Suidae* - (taxid:9821)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
seminal plasma protein pB1 [Phacochoerus africanus]	Phacochoerus africanus	116	116	100%	3e-33	37.16%	130	XP_047647499.1
seminal plasma protein pB1 precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	111	111	100%	5e-31	36.07%	130	NP_998997.1

807

808

809

810 A avaliação da presença de peptídeos sinal e regiões transmembrana nas
811 sequências das proteínas BSP5, OPN e SPAD1 foi realizada com o auxílio das
812 ferramentas SignalP e TMHMM. Entre os resultados obtidos nas análises *in*
813 *silico*, o SignalP indicou que duas das três proteínas apresentaram predição de
814 peptídeo sinal na região N-terminal (Fig. 8 - 10). Como esses peptídeos estão
815 relacionados ao direcionamento da proteína para o sistema secretor, suas
816 regiões correspondentes foram removidas das sequências utilizadas para
817 clonagem, com o objetivo de facilitar a expressão e evitar eventuais falhas no
818 processamento da proteína (Rosano et al., 2014).

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

Já a análise com o TMHMM indicou que nenhuma das proteínas apresentou predição de alças transmembrana, o que facilita a expressão eficiente das proteínas em sistemas intracelulares, evitando complicações relacionadas à inserção na membrana (Fig. 8 - 10) (Krogh et al., 2001).

831 As sequências finais das proteínas utilizadas para o desenho dos genes
 832 de clonagem foram definidas após a remoção dos peptídeos sinal, quando
 833 presentes, e a verificação da ausência de regiões transmembrana. As
 834 sequências definidas foram:

835 >OPN_Bov
 836 MERHGGEHLEQPLNSGRSWLSAAGRAGQEGSTEHCISITGDWTLAAADQGKIITMRIA
 837 ICFCLLGIASALPVKPTSSGSSEEKQLNNKYPDAVATWLPDPSQKQTFAPQNSVSSEE
 838 TDDNKQNTLPSKSNESPEQTDDLDDDDNSQDVNSNDSDDAETDDDPDHSDESHHSDES
 839 EVDFPTDIPTIAVFTPFIPTESANDGRGDSVAYGLKSRSKKFRRSNVQSPDATEEDFTSH
 840 IESEEMHDAPKKTSQLTDHSKETNSSELSKELTPKAKDKNKHSNLIENSQENSKLSQEFHS
 841 LEDKLDLDDHKSEEDKHLKIRISHELDSASSEVN

842 >SPAD1_Bov
 843 MDWLPRNTNCGGILKEESGVIATYYGPKTNCVWTIQMPPEYHVRVSIQYLQLNCN
 844 KESLEIIDGLPGSPVLGKICEGSLMDYRSSGSIMTVKYIREPEHPASFYEVLYFQ
 845 DPQA

846 >BSP5_Bov
 847 GDIPDPGSKPTPPGMADELPTETYDLPPEIYTTTFLPRTIYPQEEMPYDDKPFPS
 848 LLSKANDLNAVFEGPACAFPFYKGGKYYMCTRKNVLLWCSLDTEYQGNWKFCT
 849 ERDEPECVFPFIYRKKSYESCTRVHSFFWRRWCSTSNYDRDKAWKYC

850

851 Ao final desse processo, os genes sintéticos correspondentes às
 852 proteínas OPN, SPAD1 e BSP5 foram desenhados com base nas sequências
 853 ajustadas, visando uma expressão eficiente em *E. coli*. Para isso, foi realizada a
 854 otimização dos códons e a inclusão de sítios de restrição compatíveis com o
 855 vetor pET-28a(+), facilitando o processo de clonagem.

856

857 Gene final OPN:

858 G
 859 CTAGC ATG GAA CGC CAC GGA GGC GAA CAC TTG GAA CAG CCG CTT AAC TCC GGA
 860 CGT AGC TGG CTT AGT GCC GCG GGA CGT GCG GGT CAG GAA GGC TCA ACC GAG
 861 CAT TGT ATC AGC ATC ACA GGT GAC TGG ACG CTT TTA GCC GCA GCG GAT CAA GGT
 862 AAG ATC ATC ACG ATG CGC ATT GCT GTT ATC TGC TTC TGC CTG TTA GGT ATC GCA
 863 AGC GCC CTT CCT GTG AAA CCA ACA TCG TCA GGT TCT TCG GAA GAA AAG CAA CTG
 864 AAC AAT AAA TAC CCA GAT GCC GTC GCT ACG TGG TTG AAA CCG GAC CCA AGC CAG
 865 AAG CAG ACT TTC TTG GCT CCG CAG AAC TCT GTC TCT AGT GAG GAA ACC GAC GAT
 866 AAT AAG CAA AAT ACA TTG CCG TCA AAG AGT AAC GAA TCC CCA GAA CAA ACC GAT
 867 GAT CTT GAC GAT GAT GAC GAC AAT AGC CAG GAC GTG AAC TCC AAC GAC AGC GAT
 868 GAC GCA GAA ACC ACG GAT GAC CCA GAC CAT TCC GAT GAA TCT CAC CAC TCT GAT
 869 GAA TCA GAT GAA GTG GAT TTC CCG ACT GAC ATT CCT ACC ATT GCA GTA TTC ACG
 870 CCG TTT ATT CCA ACG GAG TCC GCA AAT GAT GGG CGT GGT GAC TCG GTG GCA TAC
 871 GGT TTG AAG TCC CGT TCA AAG AAG TTT CGC CGT AGT AAC GTC CAA TCA CCC GAT
 872 GCT ACG GAA GAA GAT TTT ACT TCA CAT ATC GAG TCA GAA GAA ATG CAC GAT GCC
 873 CCC AAA AAG ACA TCC CAG TTA ACT GAC CAT AGT AAA GAA ACA AAT TCC TCG GAA
 874 TTG AGC AAG GAA CTG ACC CCG AAA GCC AAA GAT AAG AAC AAG CAT AGT AAT TTG
 875 ATC GAG TCA CAA GAG AAT TCT AAG CTT AGC CAG GAG TTC CAT TCT TTA GAA GAT
 876 AAG TTG GAC TTG GAC CAC AAA TCG GAA GAG GAC AAA CAT TTG AAA ATT CGC ATT
 877 TCT CAC GAA CTT GAT AGT GCG TCC AGT GAA GTT AAC TAA C

878 TCGAG
 879 Sítio restrição NheI Sítio restrição XhoI Códon de terminação

880

881 **Gene final SPAD1:**

882 G

883 CTAGC ATG GAT TGG CTT CCT CGT AAC ACA AAC TGT GGC GGG ATC TTG AAA GAG
 884 GAG AGC GGC GTG ATC GCA ACA TAT TAT GGC CCG AAG ACC AAT TGC GTA TGG ACC
 885 ATC CAA ATG CCG CCC GAG TAT CAT GTC CGC GTA TCT ATC CAG TAC CTG CAA CTT
 886 AAT TGC AAT AAA GAA AGT TTG GAA ATC ATC GAC GGT TTG CCT GGA TCC CCC GTT
 887 TTA GGT AAA ATT TGT GAA GGG AGT TTA ATG GAC TAC CGT AGC TCC GGT AGC ATT
 888 ATG ACT GTT AAG TAC ATC CGT GAG CCC GAA CAT CCA GCG TCT TTC TAT GAG GTT
 889 TTG TAT TTT CAG GAT CCC CAG GCG TAA C

890 TCGAG

891 Sítio restrição NheI Sítio restrição XhoI Códon de terminação

892

893 **Gene final BSP5:**

894 G

895 CTAGC GGC GAT ATT CCA GAC CCT GGT TCC AAA CCC ACC CCA CCC GGG ATG GCG
 896 GAC GAG TTG CCC ACC GAA ACT TAC GAT CTG CCA CCC GAA ATC TAC ACA ACT ACC
 897 TTT CTG CCG CGT ACG ATT TAC CCG CAA GAA GAA ATG CCA TAT GAC GAC AAG CCA
 898 TTC CCC TCT CTG TTA TCG AAA GCA AAT GAT CTT AAT GCG GTG TTT GAG GGA CCG
 899 GCT TGT GCC TTT CCG TTC ACG TAC AAG GGT AAA AAG TAT TAT ATG TGC ACG CGT
 900 AAA AAC TCT GTA TTA CTT TGG TGC TCG TTG GAC ACC GAA TAC CAG GGA AAT TGG
 901 AAA TTT TGT ACA GAG CGT GAC GAG CCG GAA TGC GTT TTT CCC TTC ATT TAC CGT
 902 AAA AAA TCG TAC GAG TCT TGT ACT CGT GTC CAT TCT TTT TTC TGG CGT CGC TGG
 903 TGC AGT TTA ACA AGC AAC TAC GAC CGC GAC AAA GCG TGG AAG TAT TGT TAA C

904 TCGAG

905 Sítio restrição NheI Sítio restrição XhoI Códon de terminação

906

907

908 As sequências dos genes sintéticos foram traduzidas para as respectivas
 909 cadeias de aminoácidos e alinhadas com as sequências originais encontradas
 910 no UniProt. Esse passo foi importante para confirmar que os genes desenhados
 911 mantiveram a identidade das proteínas OPN, SPAD1 e BSP5. Os alinhamentos
 912 mostram que as sequências sintetizadas correspondem às proteínas nativas
 913 (Fig. 11 a 16).

914 **Figura 11.** Resultado da tradução da sequência de DNA da proteína OPN (Osteopontina).

5'3' Frame 2
 CDSCIRKQPSSRLRPLSTAAARNGACKEMAPNSPPATGPATIPTPKQALMSPKWRARSSPSVMSAI-APATAFVAVVMPATMRPA-R
 IEISIPRN-YDSL-GNCERIT IPL-K-FCLTLRRRYTMGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMERHGGEHLEQPLNSGRSWLSAAGRAG
 QEGSTEHCISITGDWTLAAADQGKIITMRIAIVICFCLLGIASALPVKPTSSGSSEEKQLNNKYPDAVATWLKPDPSQKQTF LAPQN
 SVSSEETDDNKQNTLPSKSNESPEQTDDLDLDDDDNSQDVNSNDSDDAETDDDPDHSDSHHSDESDEVDFPTDIPTIAVFTPFIPTE
 SANDGRGDSVAYGLKSRKFRFRSNVQSPDATEEEDFTSHIESEEMHDAPKKTSQLTDHSKETNSSELSKELTPKAKDKNKHSNLIES
 QENSKLSQEFHSLEDKLDLDHKSEEDKHLKIRISHELDSASSEVN-LEHHHHHH-DPAANKARKEAELAAATAEQ-LA-PLGASKRV
 LRGFLLKGGTISG-

915

916 **Figura 12.** Alinhamento da sequência da proteína recombinante OPN (OPN_Bov_recomb) com
 917 a sequência nativa (OPN_Bov).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

OPN_Bov	-----MERHGGEHLEQPLNSGRSWLSAAGRAGQEGSTEHCIS	37
OPN_Bov_recomb	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMERHGGEHLEQPLNSGRSWLSAAGRAGQEGSTEHCIS	60
OPN_Bov	ITGDWTLAAADQGKIITMRIAIVICFCLLGIASALPVKPTSSGSSEEKQLNNKYPDAVAT	97
OPN_Bov_recomb	ITGDWTLAAADQGKIITMRIAIVICFCLLGIASALPVKPTSSGSSEEKQLNNKYPDAVAT	120
OPN_Bov	WLKPDPSQKQTF LAPQNSVSSSEETDDNKQNTLPSKSNESPEQTDDLDLDDDDNSQDVNSND	157
OPN_Bov_recomb	WLKPDPSQKQTF LAPQNSVSSSEETDDNKQNTLPSKSNESPEQTDDLDLDDDDNSQDVNSND	180
OPN_Bov	SDDAETDDDPDHSDSHHSDESDEVDFPTDIPTIAVFTPFIPTESANDGRGDSVAYGLKS	217
OPN_Bov_recomb	SDDAETDDDPDHSDSHHSDESDEVDFPTDIPTIAVFTPFIPTESANDGRGDSVAYGLKS	240
OPN_Bov	RSKKFRFRSNVQSPDATEEEDFTSHIESEEMHDAPKKTSQLTDHSKETNSSELSKELTPKAK	277
OPN_Bov_recomb	RSKKFRFRSNVQSPDATEEEDFTSHIESEEMHDAPKKTSQLTDHSKETNSSELSKELTPKAK	300
OPN_Bov	DKNKHSNLIESQENSKLSQEFHSLEDKLDLDHKSEEDKHLKIRISHELDSASSEVN	333
OPN_Bov_recomb	DKNKHSNLIESQENSKLSQEFHSLEDKLDLDHKSEEDKHLKIRISHELDSASSEVN	356

918

919 >OPN_Bov_recomb
 920 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMERHGGEHLEQPLNSGRSWLSAAGRAGQEGSTEHCISITGDWTLAA
 921 ADQGKIITMRIAIVICFCLLGIASALPVKPTSSGSSEEKQLNNKYPDAVATWLKPDPSQKQTF LAPQNSVS
 922 SEETDDNKQNTLPSKSNESPEQTDDLDLDDDDNSQDVNSNDSDDAETDDDPDHSDSHHSDESDEVDFPTD
 923 IPTIAVFTPFIPTESANDGRGDSVAYGLKSRKFRFRSNVQSPDATEEEDFTSHIESEEMHDAPKKTSQLT
 924 DHSKETNSSELSKELTPKAKDKNKHSNLIESQENSKLSQEFHSLEDKLDLDHKSEEDKHLKIRISHELDS
 925 ASSEVN

926

927 **Figura 13.** Resultado da tradução da sequência de DNA da proteína SPAD1 (Espermadesina 1).

5'3' Frame 2
 CDSCIRKQPSSRLRPLSTAAARNGACKEMAPNSPPATGPATIPTPKQALMSPKWRARSSPSVMSAI-APATAFVAVVMPATMRPA-R
 IEISIPRN-YDSL-GNCERIT IPL-K-FCLTLRRRYTMGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMDWLPRNTNCGGILKEESGVVIATYYGP
 KTNVCVWTIQMPPEYHVRVSIQYLQLCNKESLEIIDGLPGSVLGLKICEGSLMDYRSGSIMITVKYIREPEHPASFYEVLYFQDPQA
 -LEHHHHHH-DPAANKARKEAELAAATAEQ-LA-PLGASKRVLRGFLLKGGTISG-

928

929 **Figura 14.** Alinhamento da sequência da proteína recombinante SPAD1 (SPAD1_Bov_recomb)
930 com a sequência nativa (SPAD1_Bov).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SPAD1_Bov      -----MDWLP RNTNCGGILKEESGVIATYYGPKTNCVWTIQM      37
SPAD1_Bov_recomb  MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMDWLP RNTNCGGILKEESGVIATYYGPKTNCVWTIQM      60
                *****

SPAD1_Bov      PPEYHVRVSIQYLQ LNCNKESLEIIDGLPGSPVLGKICEGSLMDYRSSGSIMTVKYIREP      97
SPAD1_Bov_recomb  PPEYHVRVSIQYLQ LNCNKESLEIIDGLPGSPVLGKICEGSLMDYRSSGSIMTVKYIREP      120
                *****

SPAD1_Bov      EHPASFYEVLYFQDPQA 114
SPAD1_Bov_recomb  EHPASFYEVLYFQDPQA 137
                *****

```

931

932 >SPAD1_Bov_recomb

933 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMDWLP RNTNCGGILKEESGVIATYYGPKTNCVWTIQMPPEYHVRVSI
934 QYLQ LNCNKESLEIIDGLPGSPVLGKICEGSLMDYRSSGSIMTVKYIREPEHPASFYEVLYFQDPQA
935

936 **Figura 15.** Resultado da tradução da sequência de DNA da proteína BSP5 (*Binder of Sperm*
937 *Protein 5*).

```

5'3' Frame 1
MSAT-APATAPVAPVMPATMRPA-RIEISIPRN-YDSL-GNCERITIPL-K-FCLTLRRRYT MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASGDI PDPGSKPTPPGMADELPTET YDLPPEIYTTTFLP
RTIYPQEEMPYDDKPFPSLLSKANDLNAVFE GPACAFPFTYK GKYYMCTRKNSVLLWCSLDTEYQGNWKFCTERDEPECVFPFIYRKKSYESCTRVHSFFWRRWCSLTSNYDRDKAWKYC-
LEHHHHHH-DPAANKARKEAELAAATAEQ-LA-PLGASKRVLRGFLLRGGTISG-

```

938

939 **Figura 16.** Alinhamento da sequência da proteína recombinante BSP5 (BSP5_Bov_recomb) com
940 a sequência nativa (BSP5_Bov).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

BSP5_Bov_recomb  MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASGDI PDPGSKPTPPGMADELPTET YDLPPEIYTTTFLP      60
BSP5_Bov      -----GDIPDPGSKPTPPGMADELPTET YDLPPEIYTTTFLP      37
                *****

BSP5_Bov_recomb  RTIYPQEEMPYDDKPFPSLLSKANDLNAVFE GPACAFPFTYK GKYYMCTRKNSVLLWCS      120
BSP5_Bov      RTIYPQEEMPYDDKPFPSLLSKANDLNAVFE GPACAFPFTYK GKYYMCTRKNSVLLWCS      97
                *****

BSP5_Bov_recomb  LDTEYQGNWKFCTERDEPECVFPFIYRKKSYESCTRVHSFFWRRWCSLTSNYDRDKAWKY      180
BSP5_Bov      LDTEYQGNWKFCTERDEPECVFPFIYRKKSYESCTRVHSFFWRRWCSLTSNYDRDKAWKY      157
                *****

BSP5_Bov_recomb  C 181
BSP5_Bov      C 158
                *

```

941

942 >BSP5_Bov_recomb

943 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASGDI PDPGSKPTPPGMADELPTET YDLPPEIYTTTFLPRTIYPQEEMP
944 YDDKPFPSLLSKANDLNAVFE GPACAFPFTYK GKYYMCTRKNSVLLWCSLDTEYQGNWKFCTERDEPEC
945 VFPFIYRKKSYESCTRVHSFFWRRWCSLTSNYDRDKAWKYC
946

947 De modo geral, os alinhamentos entre as proteínas recombinantes e suas
948 versões nativas mostraram que as sequências foram preservadas corretamente

949 mesmo após as etapas de otimização e síntese. As únicas diferenças
 950 observadas foram a remoção dos peptídeos sinal, quando presentes, e a adição
 951 da cauda His-tag, necessária para a purificação. Essas modificações não afetam
 952 a estrutura essencial das proteínas, o que reforça a fidelidade dos genes
 953 desenhados e a confiança nos produtos obtidos para as proteínas OPN, SPAD1
 954 e BSP5.

955 Por fim, os genes sintéticos correspondentes às proteínas OPN, SPAD1
 956 e BSP5, já otimizados e validados por meio das análises anteriores, foram
 957 utilizados para a construção dos clones no vetor de expressão pET-28a(+). A
 958 clonagem foi terceirizada via empresa Genone.

959

```
960 >OPN_Bov_recomb
961 CTAGCATGGAACGCCACGGAGGCGAACACTTGGAAACAGCCGCTTAACTCCGGACGTAGCTGGCTTAGTG
962 CGCGGGACGTGCGGGTCAGGAAGGCTCAACCGAGCATTGTATCAGCATCACAGGTGACTGGACGCTTTTA
963 GCCGCAGCGGATCAAGGTAAGATCATCACGATGCGCATTGCTGTTATCTGCTTCTGCCTGTTAGGTATCG
964 CAAGCGCCCTTCCTGTGAAACCAACATCGTCAGGTTCTTCGGAAGAAAAGCAACTGAACAATAAATACCC
965 AGATGCCGTCGCTACGTGGTTGAAACCGGACCCAAGCCAGAAGCAGACTTCTTGGCTCCGCAGAACTCT
966 GTCTCTAGTGAGGAAACCGACGATAATAAGCAAAATACATTGCCGTCAAAGAGTAACGAATCCCCAGAAC
967 AAACCGATGATCTTGACGATGATGACGACAATAGCCAGGACGTGAACCCAACGACAGCGATGACGCAGA
968 AACCACGGATGACCCAGACCATTCGGATGAATCTCACCACCTGATGAATCAGATGAAGTGGATTTCCCG
969 ACTGACATTCCATTCCATTGCAATTCACGCCGTTTTATTCCAACGGAGTCCGCAAATGATGGGCGTGGTG
970 ACTCGGTGGCATAACGGTTTGAAGTCCCGTTCAAAGAAGTTTTCGCCGTAGTAACGTCCAATCACCCGATGC
971 TACGGAAGAAGATTTTACTTACATATCGAGTCAGAAGAAATGCACGATGCCCCAAAAAGACATCCAG
972 TTAACTGACCATAGTAAAAGAAACAAATTCCTCGGAATTGAGCAAGGAACTGACCCGAAAGCCAAAGATA
973 AGAACAAAGCATAGTAATTTGATCGAGTCACAAGAGAATTTCTAAGCTTAGCCAGGAGTCCATTCTTTAGA
974 AGATAAGTTGGACTTGGACCACAAATCGGAAGAGGACAAACATTTGAAAATTCGCATTTCTCACGAACTT
975 GATAGTGGTCCAGTGAAGTTAACTAAC
```

976

```
>SPAD1_Bov_recomb
977 CTAGCATGGATTGGCTTCCTCGTAACACAACTGTGGCGGGATCTTGAAAGAGGAGAGCGGGCGTGATCGC
978 AACATATTATGGCCCGAAGACCAATTGCGTATGGACCATCCAAATGCCGCCGAGTATCATGTCCGCGTA
979 TCTATCCAGTACCTGCAACTTAATTGCAATAAAGAAAGTTTGGAAATCATCGACGGTTTGCCTGGATCCC
980 CCGTTTTAGGTAAAAATTTGTGAAGGGAGTTTAAATGGACTACCGTAGCTCCGGTAGCATTATGACTGTTAA
981 GTACATCCGTGAGCCCGAACATCCAGCGTCTTCTATGAGGTTTTGTATTTTCAGGATCCCCAGGCGTAA
982 C
```

983

```
BSP5_Bov_recomb
984 CTAGCGGCGATATTCCAGACCCTGGTTCCAAACCCACCCACCCGGGATGGCGGACGAG
985 TTGCCACCGAAACTTACGATCTGCCACCCGAAATCTACACAACCTACCTTTCTGCCGCG
986 TACGATTTACCCGCAAGAAGAAATGCCATATGACGACAAGCCATTCCCCTCTCTGTTAT
987 CGAAAGCAAATGATCTTAATGCGGTGTTTGGAGGGACCGGCTTGTGCCTTTCCGTTTACG
988 TACAAGGGTAAAAAGTATTATATGTGCACGCGTAAAACTCTGTATTACTTTGGTGCTC
989 GTTGGACACCGAATACCAGGGAAATTTGGAAATTTTGTACAGAGCGTGACGAGCCGGAAT
990 GCGTTTTTCCCTTCATTTACCGTAAAAAATCGTACGAGTCTTGTACTCGTGTCCATTCT
991 TTTTTCTGGCGTCGCTGGTGCAGTTTAAACAAGCAACTACGACCGGACAAAGCGTGGAA
992 GTATTGTTAAC
```

993

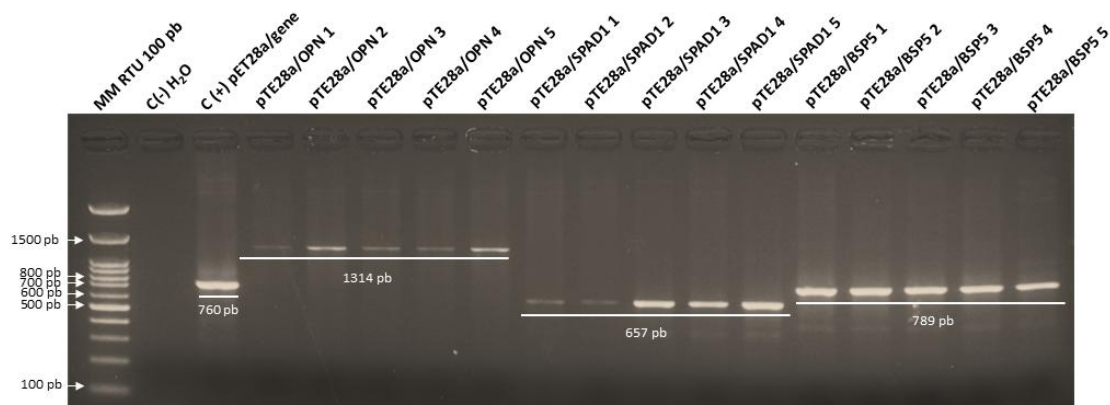
994 5.2 Confirmação das clonagens

995 A clonagem dos genes das proteínas recombinantes foi confirmada pela
 996 análise de PCR. O par de primers referente ao promotor T7 do vetor amplifica
 997 um fragmento de DNA de aproximadamente 300 pb quando o vetor está vazio.
 998 Com a inserção do gene de cada proteína no vetor, o fragmento amplificado
 999 aumenta conforme o tamanho do gene inserido, resultando em um produto de
 1000 PCR maior para os clones positivos. No caso dos clones pET28a/OPN, o gene
 1001 de OPN tem 1014 pb, e, utilizando o par de primers do promotor T7, o produto
 1002 de amplificação esperado é de aproximadamente 1300 pb (1014 pb + 300 pb).
 1003 As bandas amplificadas para os 5 clones de pET28a/OPN aparecem pouco
 1004 abaixo de 1500 pb, de acordo com o marcador, confirmando a presença dos
 1005 genes nos cinco clones (Fig. 17).

1006 Para o gene de SPAD1, que possui 357 pb, o produto de PCR esperado é
 1007 de aproximadamente 657 pb (357 pb + 300 pb). É possível observar bandas
 1008 amplificadas no padrão esperado para os cinco clones de pET28a/SPAD1 (Fig.
 1009 17). De maneira similar, o gene de BSP5 tem 489 pb, e o produto de PCR
 1010 resultante deveria ser de cerca de 789 pb (489 pb + 300 pb) (Fig. 17). As bandas
 1011 observadas para os cinco clones de pET28a/BSP5 estão de acordo com esse
 1012 padrão, confirmando a clonagem bem-sucedida.

1013

1014 **Figura 17.** Confirmação da clonagem dos genes das proteínas OPN, SPAD1 e BSP5 no vetor
 1015 de expressão pET28a, por eletroforese em gel de agarose.



1016

1017 A amplificação do produto de PCR correspondente ao gene de cada proteína é evidenciado pelas
 1018 barras brancas. Bandas de 1314 pb é referente aos clones de 1-5 de pET28a/OPN, bandas de
 1019 657 pb é referente aos clones de 1-5 de pET28a/SPAD1 e bandas de 789 pb é referente aos

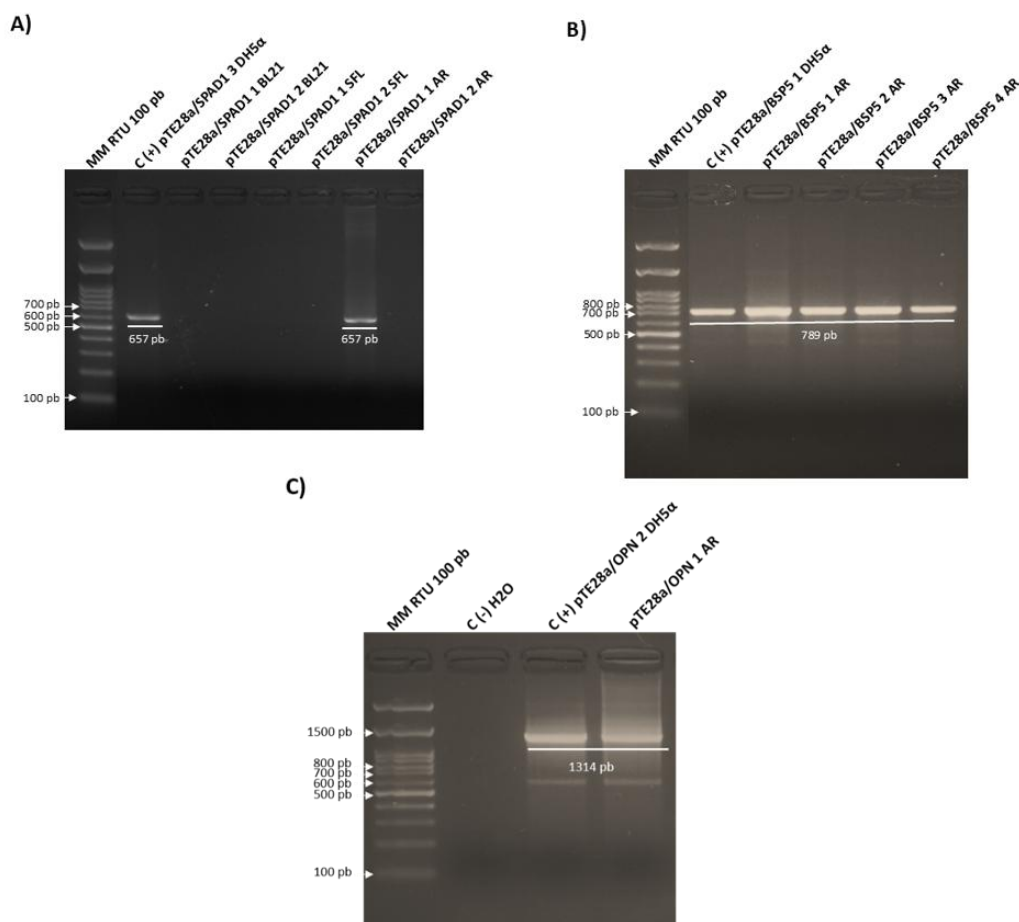
1020 clones de 1-5 de pET28a/BSP5. **MM:** Padrão de bandejamento de DNA 100 pb 3'RTU. C-: Água
1021 foi utilizada como controle negativo. C+: um gene de 460 pb clonado em pET28a foi utilizado
1022 como controle positivo.
1023

1024 **5.3 Expressão das proteínas recombinantes em pequena escala**

1025 **5.3.1 Testes de cepa**

1026
1027 A inserção dos genes recombinantes foi confirmada para as três proteínas
1028 em estudo, porém apenas nas transformações realizadas com a cepa *E. coli*
1029 Arctic Express (Fig. 18A–C). Para o plasmídeo pET28a/SPAD1-3, foi identificado
1030 o fragmento esperado de 657 pb no DNA plasmidial extraído da Arctic Express
1031 (clone 1), enquanto os clones obtidos nas cepas BL21(DE3) e SHuffle® T7 não
1032 apresentaram amplificação. A validação foi realizada por comparação com o
1033 controle positivo (clone 3 de pET28a/SPAD1 em *E. coli* DH5 α), que exibiu uma
1034 banda com o mesmo tamanho (Fig. 18A). De forma similar, quatro clones de
1035 pET28a/BSP5-1 transformados na cepa Arctic Express apresentaram o produto
1036 de PCR com o tamanho esperado de 789 pb, confirmando a inserção do gene
1037 (Fig. 18B). Esse resultado também foi validado pela comparação com o controle
1038 positivo (DNA plasmidial do clone 1 de pET28a/BSP5 transformado em *E. coli*
1039 DH5 α), que apresenta o mesmo padrão de amplificação (Fig. 18B). A
1040 transformação de pET28a/OPN-1 também foi validada por meio da comparação
1041 com a banda amplificada do controle positivo (DNA plasmidial do clone 2 de
1042 pET28a/OPN transformado em *E. coli* DH5 α), além da banda esperada de 1314
1043 pb (Fig. 18C).

1044 **Figura 18:** Inserção dos clones pET28a/SPAD1-3, pET28a/BSP5-1 e pET28a/OPN-1 nas
 1045 diferentes cepas.



1046

1047

1048 **A)** Eletroforese em gel de agarose 2 % contendo os produtos de PCR do gene de
 1049 pET28a/SPAD1-3 transformados nas cepas de expressão de *E. coli* BL21 DE3 (1 e 2), SHuffle®
 1050 T7 (1 e 2) e Arctic Express (1 e 2). Banda de 657 pb é referente ao clone 1 de pET28a/SPAD1-3
 1051 transformado em *E. coli* Arctic Express. **B)** Eletroforese em gel de agarose 2 % contendo os
 1052 produtos de PCR do gene de pET28a/BSP5-1 transformado na cepa de expressão *E. coli* Arctic
 1053 Express (1 a 4). Bandas de 789 pb é referente aos clones 1 a 4 de pET28a/BSP5-1
 1054 transformados. **C)** Eletroforese em gel de agarose 2 % contendo os produtos de PCR do gene
 1055 de pET28a/OPN-1 transformado na cepa de expressão *E. coli* Arctic Express, com bandas de
 1056 1314 pb. A amplificação do produto de PCR correspondente ao gene de cada proteína é
 1057 evidenciado pelas barras brancas. **MM:** Padrão de bandeamento de DNA 100 pb 3'RTU. **C-:**
 1058 DNA plasmidial clone 3 pET28a/SPAD1, clone 1 pET28a/BSP5 e clone 2 pET28a/OPN
 1059 transformados em *E. coli* DH5α. **C-**

1060 5.3.2 Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE)

1061

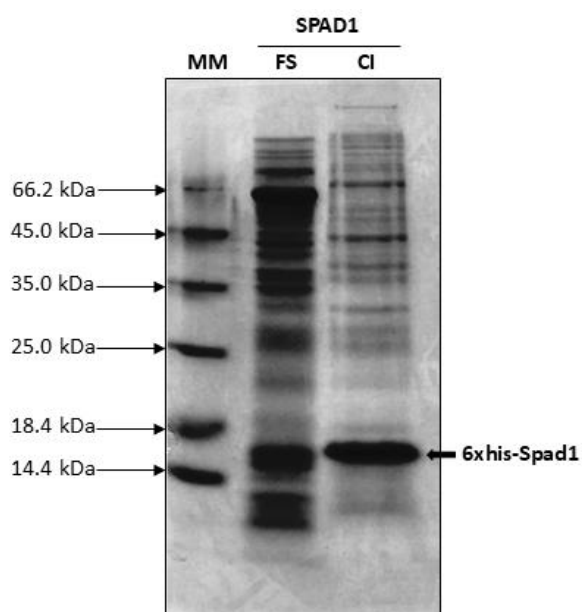
1062 As proteínas recombinantes 6xHis-SPAD1, 6xHis-OPN e 6xHis-BSP5
 1063 apresentaram pesos moleculares teóricos de 15,37 kDa, 36,7 kDa e 21,07 kDa,

1064 respectivamente, conforme predição *in silico* realizada pelo software ProtParam
1065 (Gasteiger et al., 2005). Essa estimativa foi obtida a partir da análise das
1066 sequências dos genes clonados, traduzidas pela ferramenta, permitindo prever
1067 propriedades básicas das proteínas, como massa molecular e composição de
1068 aminoácidos.

1069 A presença das proteínas recombinantes SPAD1, OPN e BSP5 foi
1070 confirmada por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-
1071 PAGE), com base nos pesos moleculares previstos. A proteína SPAD1
1072 apresentou expressão satisfatória em ambas as frações avaliadas, com maior
1073 intensidade na fração insolúvel (corpo de inclusão - CI) em comparação à fração
1074 solúvel (FS) (Fig. 19). Uma banda bem definida, localizada entre 14,4 kDa e 18,4
1075 kDa, corresponde ao peso molecular estimado da proteína recombinante 6xHis-
1076 SPAD1, confirmando sua expressão (Fig. 19). As proteínas BSP5 e OPN foram
1077 expressas sob as mesmas condições experimentais, no entanto, a
1078 documentação fotográfica dos respectivos géis de SDS-PAGE não foi registrada,
1079 sendo realizado somente o Western blotting.

1080

1081 **Figura 19:** Teste de expressão 6xhis-SPAD1.



1082

1083 Eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida 14% das frações FS e CI resultantes da
1084 expressão de 6xhis-SPAD1 com 1 mM de IPTG por 24h a 12 °C, sob agitação de 180 rpm. **MM:**

1085 Marcador molecular com intervalo de 14,4 a 66,2 kDa; canaleta 1: marcador molecular; canaleta
1086 2: fração solúvel; canaleta 3: corpo de inclusão.

1087

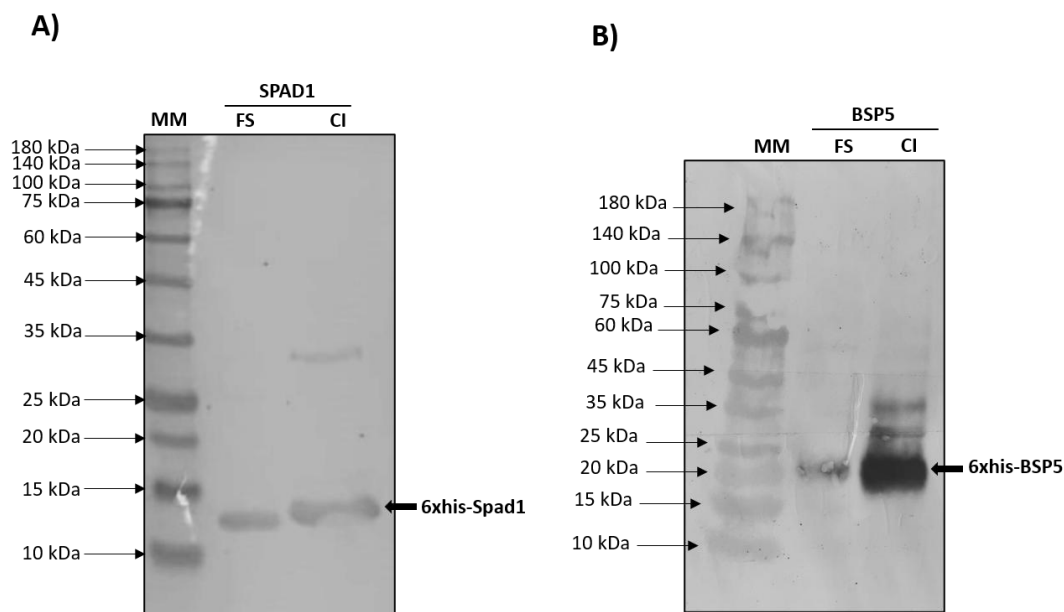
1088 **5.3.3 Western blotting**

1089 A identidade das proteínas recombinantes SPAD1 e BSP5 foi confirmada
1090 por Western blotting, com imunodeteção bem sucedida após separação por
1091 SDS-PAGE e transferência para membrana de nitrocelulose (Fig. 20). A mesma
1092 condição experimental foi utilizada para a proteína OPN, embora sua detecção
1093 não tenha sido observada.

1094 De acordo com o software ProtParam (Expasy, 2025), o peso molecular
1095 teórico da proteína recombinante 6xHis-SPAD1 foi de 15,37 kDa. No Western
1096 blotting, a 6xHis-SPAD1 foi reconhecida pelo anticorpo anti-His, evidenciada por
1097 uma banda localizada próxima a 15 kDa, observada em ambas as frações,
1098 solúvel (FS) e insolúvel (CI). Essa banda corresponde às observadas
1099 anteriormente na SDS-PAGE (Fig. 20), sendo compatível com o peso molecular
1100 predito. Esses resultados confirmam a expressão da proteína recombinante
1101 SPAD1 nas duas frações.

1102 Para a 6xHis-BSP5, embora a banda da fração insolúvel (CI) tenha
1103 apresentado maior intensidade em comparação à da fração solúvel (FS), a
1104 proteína está presente em ambas. De forma similar, a análise *in silico* realizada
1105 com o software ProtParam previu um peso molecular teórico de 21,07 kDa para
1106 a proteína recombinante 6xHis-BSP5, o que é compatível com a banda
1107 observada próxima a 20 kDa em ambas as frações, nas quais a proteína foi
1108 expressa de maneira significativa. Segundo Li et al. (2022) e Rosano et al.
1109 (2014), a detecção específica dessas bandas é atribuída à cauda de histidina
1110 (His-tag) presente nas proteínas recombinantes, que possibilita a interação
1111 seletiva com os anticorpos utilizados.

1112 **Figura 20:** Confirmação por Western blotting do teste de expressão de 6xhis-SPAD1 e 6xhis-
 1113 BSP5, marcada com anticorpo anti-His.



1114 **A)** SPAD1: canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: fração solúvel; canaleta 3: corpo de
 1115 inclusão. **B)** BSP5: canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: fração solúvel; canaleta 3: corpo
 1116 de inclusão. **MM:** Marcador molecular com intervalo de 10 a 180 kDa. Setas mostram a banda
 1117 referente a proteína em cada fração analisada.
 1118

1119
 1120 As proteínas recombinantes BSP5 e SPAD1 foram expressas em *E. coli*
 1121 Arctic Express predominantemente na forma de corpos de inclusão, o que
 1122 direcionou a escolha do protocolo de purificação. A formação de corpos de
 1123 inclusão em *E. coli* tende a ocorrer pelo ao alto nível de expressão e às condições
 1124 celulares específicas, conforme relatado por Rueda et al. (2014). Além disso,
 1125 estes podem ocorrer devido à dificuldade da bactéria em expressar proteínas
 1126 mais complexas, especialmente aquelas que possuem múltiplas ligações
 1127 dissulfeto, dificultando o redobramento posterior e resultando em frações
 1128 insolúveis conhecidas como corpos de inclusão (Demain et al., 2009; Choi & Lee,
 1129 2004). Estes, são originados principalmente pela falta de mecanismos celulares
 1130 adequados para que haja o dobramento correto de proteínas heterólogas, e à
 1131 alta taxa de expressão dessas proteínas no citoplasma (Gonzalez et al., 2006).
 1132 Em função disso, essas proteínas podem apresentar instabilidade, tornando-as
 1133 funcionalmente inativas ou insolúveis, como foi observado neste trabalho
 1134 (Ferrer-Miralles et al., 2009).

1135 A proteína recombinante OPN não apresentou imunomarcacão
1136 detectável, mesmo após repetição do experimento sob as mesmas condições de
1137 indução, incluindo o uso de culturas frescas. Diante disso, algumas hipóteses
1138 podem ser levantadas para explicar a ausência de expressão detectável dessa
1139 proteína. Uma possibilidade é que a concentração de IPTG utilizada (1 mM),
1140 embora dentro da faixa recomendada pela literatura (0–1 mM), possa não ter
1141 sido a ideal para a indução da OPN. Concentrações elevadas de IPTG podem
1142 causar toxicidade às células hospedeiras, enquanto concentrações muito baixas
1143 podem ser insuficientes para promover a expressão (Li et al., 2022; Abedi et al.,
1144 2012; Mühlmann et al., 2017). Além disso, o tempo e a temperatura de incubação
1145 utilizados, 24 horas a 12 °C, podem ter influenciado negativamente a expressão.
1146 Ambos os parâmetros exercem forte impacto sobre o rendimento e a solubilidade
1147 de proteínas recombinantes, e condições inadequadas podem comprometer a
1148 expressão ou a detecção da proteína de interesse (Abedi et al., 2012; Mühlmann
1149 et al., 2017; Li et al., 2022).

1150 Outro aspecto relevante diz respeito à natureza estrutural da OPN. Por se
1151 tratar de uma glicoproteína que depende de modificações pós-traducionais como
1152 glicosilação e fosforilação para adquirir sua conformação funcional, a expressão
1153 em *E. coli*, um sistema que não realiza essas modificações, pode ter
1154 comprometido seu dobramento e estabilidade (Hunter, 2013; Rittling et al., 2004;
1155 Ferrer-Micales et al., 2009; Freigassner et al., 2009; Demaia et al., 2009; Sahdev
1156 et al., 2008). Em contraste, as proteínas BSP5 e SPAD1, estruturalmente menos
1157 complexas, não dependem dessas modificações, o que pode justificar sua
1158 expressão bem-sucedida nas mesmas condições.

1159 Por fim, também se considera a possibilidade de toxicidade associada à
1160 expressão da OPN. Algumas proteínas recombinantes, quando acumuladas ou
1161 mal dobradas, podem exercer efeitos deletérios sobre a célula hospedeira,
1162 resultando na supressão de sua própria expressão (Dumon-Seignovert et al.,
1163 2004; Rosano et al., 2014). Portanto, a ausência de expressão da OPN pode
1164 estar relacionada a fatores experimentais, como tempo, temperatura, indução e
1165 toxicidade, bem como a limitações inerentes à própria bactéria hospedeira.

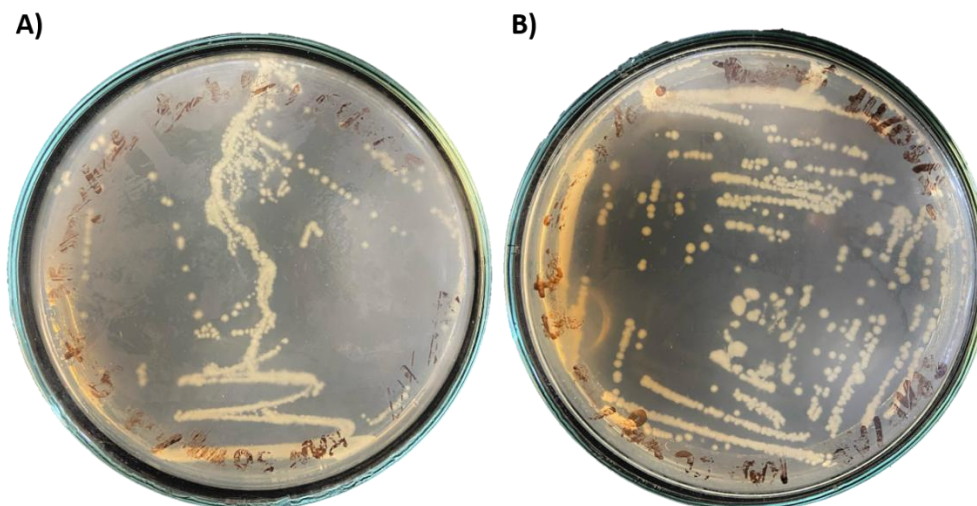
1166 5.4 Expressão das proteínas recombinantes em larga escala

1167 5.4.1 Cultivo bacteriano

1168
1169 As cepas *E. coli* Arctic Express transformadas com os plasmídeos
1170 contendo os genes das proteínas recombinantes BSP5 e SPAD1 apresentaram
1171 crescimento satisfatório (Fig. 21A e B, respectivamente). O crescimento definido
1172 e abundante das colônias em ambas as placas demonstra que as condições de
1173 cultivo utilizadas foram adequadas e que o protocolo de transformação foi eficaz.
1174 A presença do antibiótico seletivo no meio garante que apenas as colônias
1175 transformadas, contendo o plasmídeo com o gene de interesse e o gene de
1176 resistência à canamicina, fossem capazes de se desenvolver, reforçando o
1177 sucesso da seleção das cepas recombinantes.

1178 A seleção das colônias transformadas ocorre por meio da presença de
1179 antibióticos no meio de cultura, uma vez que o plasmídeo recombinante contém
1180 um gene de resistência que atua como marcador seletivo, impedindo o
1181 crescimento de células não transformadas (Rosano et al., 2014). Dessa forma,
1182 apenas as cepas que incorporaram corretamente o vetor recombinante são
1183 capazes de se desenvolver sob essas condições. Assim, o crescimento
1184 observado nas colônias, portanto, valida a eficiência tanto da transformação
1185 quanto do processo de seleção das cepas recombinantes (Figuras 21A e B).

1186
1187 **Figura 21:** Placas de Petri de com ágar sólido contendo as culturas da cepa Arctic Express de
1188 BSP5 (A) e SPAD1 (B), após incubação a 37°C por 16 horas.



1189

1190 5.4.2 Quantificação por Bradford

1191

1192 A quantificação das proteínas recombinantes, realizada por meio do
 1193 método de Bradford, indicou menor rendimento para as amostras de SPAD1,
 1194 com uma concentração aproximada de 18,032 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em contraste, as amostras
 1195 de BSP5 apresentaram rendimento superior, com cerca de 21,129 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de
 1196 proteína total. É importante destacar que esses valores não correspondem
 1197 exclusivamente às proteínas de interesse, pois nas amostras estão presentes
 1198 demais proteínas, além de contaminantes, a serem removidos posteriormente
 1199 através da purificação.

1200

1201 **Tabela 4.** Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) das amostras de SPAD1 e BSP5.

SPAD1			BSP5		
Amostra	Diluição	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Amostra	Diluição	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
0h FS	A	0,07	0h FS	A	0,08
0h CI	A	0,12	0h CI	A	0,40
S 24h FS 1	B	2,36	B 24h FS 1	B	1,16
S 24h CI 1	C	5,948	B 24h CI 1	C	8,064
S 24h FS 2	B	1,89	B 24h FS 2	B	1,91
S 24h CI 2	C	6,996	B 24h CI 2	C	5,102
S 24h FS 3	B	1,71	B 24h FS 3	B	2,01
S 24h CI 3	C	5,088	B 24h CI3	C	7,963

1202

1203 Diluição A - 10 μl de amostra + 190 μl Bradford; B - 2 μl de amostra + 8 μl de tampão binding
 1204 buffer sem ureia e binding buffer com ureia + 190 μl Bradford; C - 10 μl de amostra + 5 μl de H_2O
 1205 Milli-Q + 190 μl de Bradford.

1206

1207 5.4.3 Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) e Western blotting

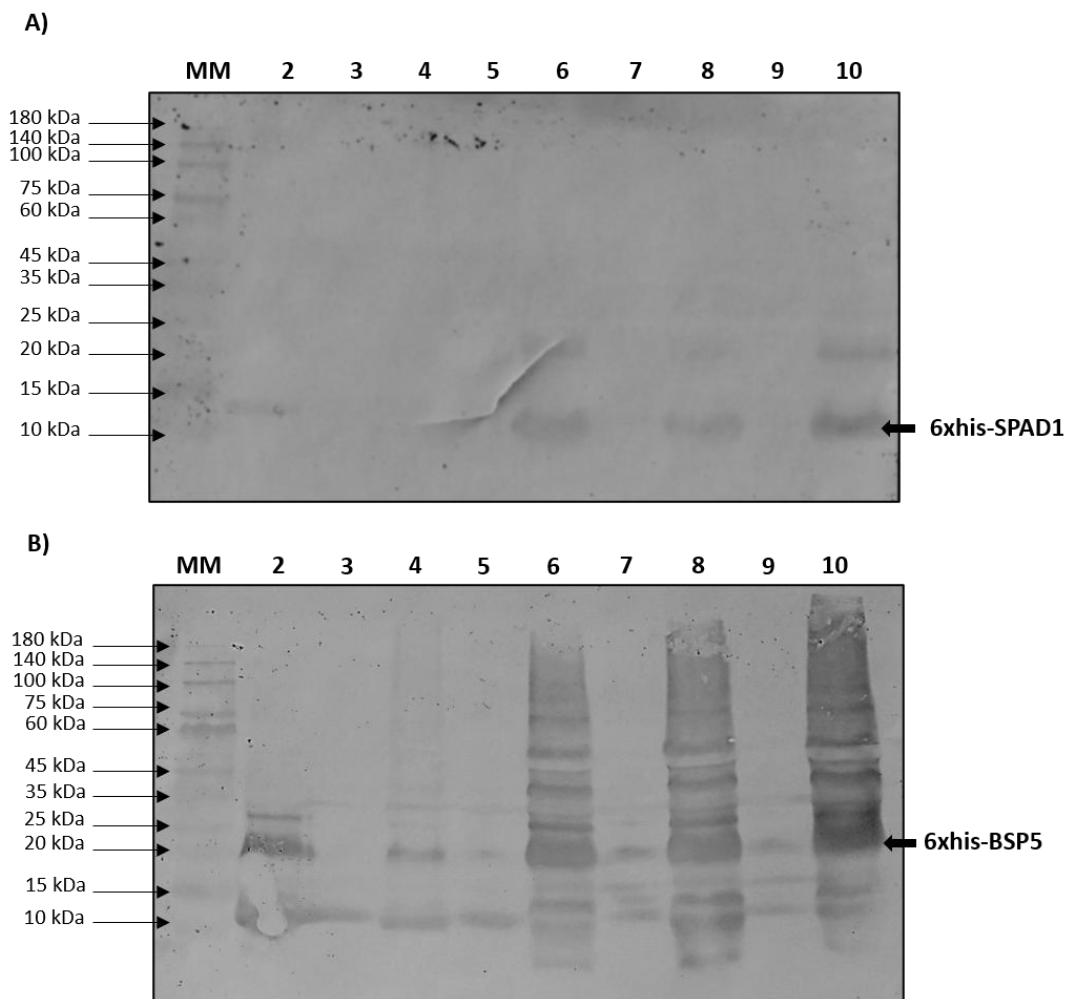
1208 Conforme observado nos testes em pequena escala, a presença das
 1209 proteínas recombinantes BSP5 e SPAD1 foi confirmada por eletroforese
 1210 unidimensional (SDS-PAGE) e Western blotting (Fig. 22). De forma semelhante,
 1211 nos cultivos em larga escala, foram detectadas bandas com aproximadamente
 1212 15 kDa, compatíveis com o peso molecular teórico de 15,37 kDa para a proteína
 1213 SPAD1, e bandas próximas a 20 kDa, correspondentes ao valor teórico de 21,07

1214 kDa para a BSP5. Esses resultados confirmam a expressão bem-sucedida de
1215 ambas as proteínas também em uma escala superior. Observa-se que nos dois
1216 tempos analisados após a adição da molécula de IPTG (0 h e 24 h), as bandas
1217 mais intensas estão concentradas nas frações insolúveis (corpos de inclusão),
1218 indicando que uma proporção significativa das proteínas recombinantes foi
1219 expressa nessa forma (Fig. 22).

1220 Além disso, foram observadas marcações adicionais e inespecíficas em
1221 ambas as membranas de nitrocelulose após a transferência por western blotting.
1222 Essas bandas inesperadas podem estar associadas a diversos fatores técnicos.
1223 De acordo com Bass et al. (2017), concentrações elevadas de anticorpos
1224 primários ou secundários, impurezas presentes nas amostras, excesso de
1225 proteína carregada no gel, preparo inadequado da solução de bloqueio com BSA
1226 e tempos de incubação insuficientes ou prolongados podem comprometer a
1227 especificidade da imunodeteção, favorecendo o aparecimento de bandas não
1228 específicas.

1229

1230 **Figura 22:** Western blotting anti-His da expressão de proteínas em larga escala por sistema de
 1231 transferência semi-seco de SPAD1 e BSP5.



1232 **A)** SPAD1 - canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: 0h FS;
 1233 canaleta 4: 0h CI; canaleta 5: 24h 1 FS; canaleta 6: 24h 1 CI; canaleta 7: 24h 2 FS; canaleta 8:
 1234 24h 2 CI; canaleta 9: 24h 3 FS; canaleta 10: 24h 3 CI. **B)** BSP5 - canaleta 1: marcador molecular;
 1235 canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: 0h FS; canaleta 4: 0h CI; canaleta 5: 24h 1 FS; canaleta
 1236 6: 24h 1 CI; canaleta 7: 24h 2 FS; canaleta 8: 24h 2 CI; canaleta 9: 24h 3 FS; canaleta 10: 24h 3
 1237 CI. **MM:** Marcador molecular com intervalo de 10 a 180 kDa. As setas mostram as bandas
 1238 referentes as proteínas DPAD1 e BSP5, respectivamente.
 1239
 1240

1241

1242 5.4.4 Purificação das proteínas

1243

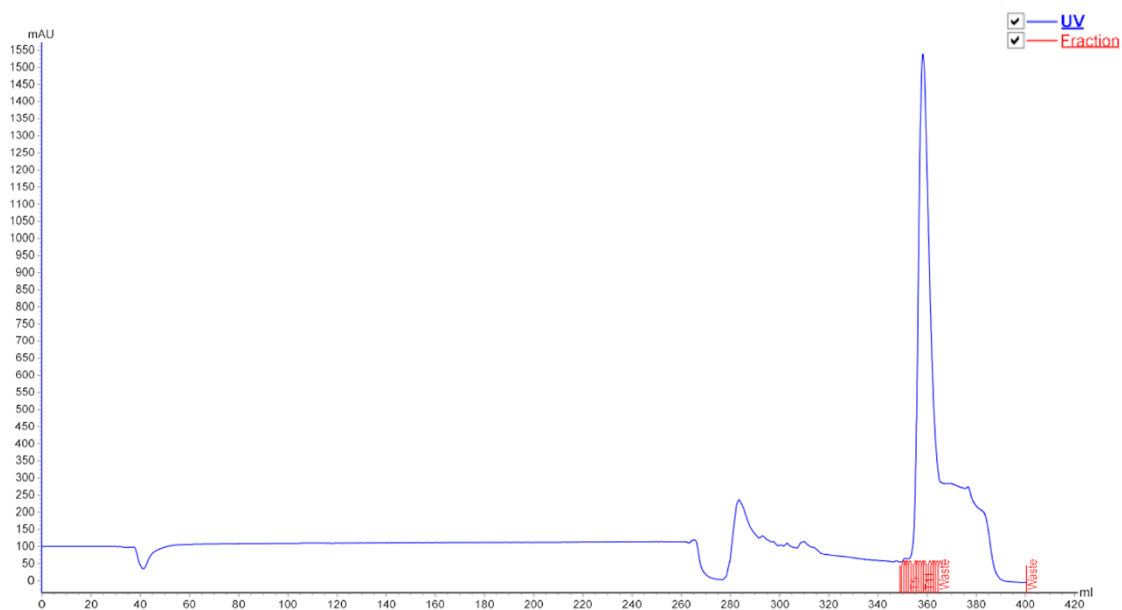
1244 A purificação das proteínas recombinantes SPAD1 e BSP5 por
 1245 cromatografia de afinidade, utilizando a coluna Ni²⁺ HisTrap FF, foi realizada com
 1246 sucesso (Fig. 23 e 24). Os cromatogramas obtidos demonstraram a eficiência do
 1247 sistema em recuperar ambas as proteínas, apresentando perfis de eluição

1248 semelhantes. Essa eficácia deve-se à presença da cauda de histidina (6xHis) na
1249 extremidade N-terminal das proteínas, que confere alta afinidade pelos íons de
1250 níquel immobilizados na matriz da coluna (Li et al., 2022; Rosano et al., 2014).
1251 Essa interação permite a retenção seletiva das proteínas recombinantes, que
1252 são eluídas de forma específica, garantindo sua separação das demais proteínas
1253 bacterianas presentes no extrato celular e promovendo maior pureza nas
1254 amostras (Li et al., 2022; Rosano et al., 2014).

1255 Na purificação da proteína SPAD1, observou-se que o pico de eluição se
1256 iniciou na fração 6 e se manteve até a fração 15, seguido de estabilização,
1257 indicando uma eluição completa e contínua (Fig. 23). Por outro lado, na
1258 purificação da BSP5, o pico de eluição também começou na fração 6 e se
1259 estendeu até a fração 15, porém foi acompanhado por múltiplos picos
1260 subsequentes, o que pode sugerir a presença de impurezas residuais ou
1261 diferentes isoformas da proteína (Fig. 24). A análise comparativa dos perfis de
1262 eluição sugere que a proteína recombinante SPAD1 apresentou um perfil mais
1263 homogêneo, caracterizado por um único pico de eluição, indicando uma
1264 purificação mais específica e limpa.

1265

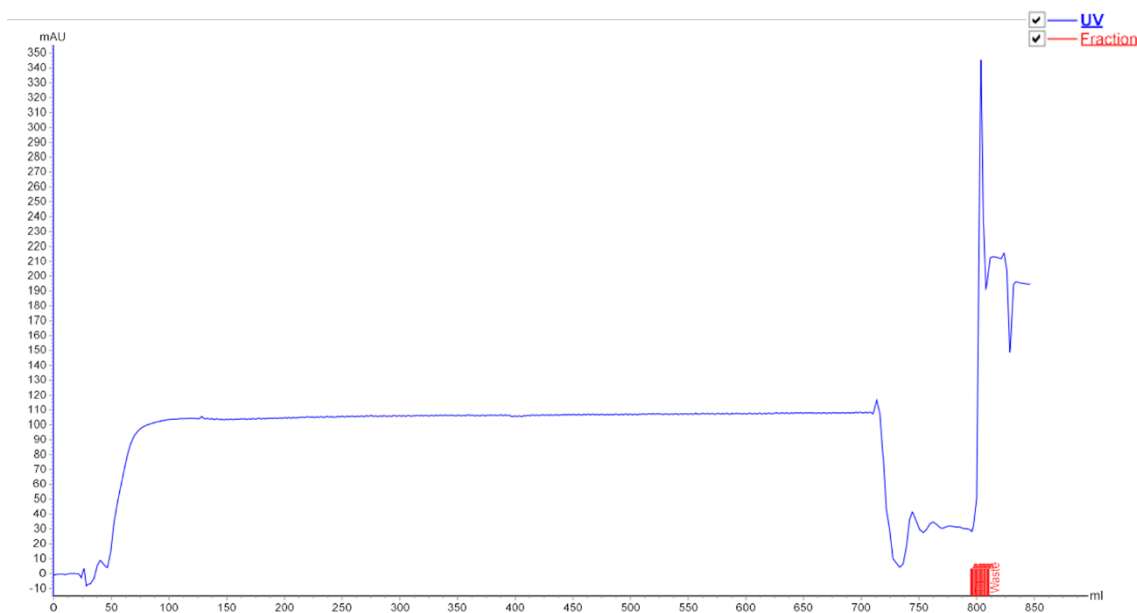
1266 **Figura 23:** Purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de SPAD1, com início
1267 do pico na fração 6 e final na fração 15.



1268

1269

1270 **Figura 24:** Purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de BSP5, com início
 1271 do pico na fração 6 e final na fração 15.



1272

1273

1274 5.4.5 Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE)

1275

1276

1277

1278

1279

1280

1281

1282

1283

A análise por SDS-PAGE das frações obtidas durante a purificação por cromatografia de afinidade confirmou a recuperação bem-sucedida das proteínas recombinantes SPAD1 e BSP5. Em ambas as eletroforeses, foram observadas bandas bem definidas compatíveis com os pesos moleculares teóricos das respectivas proteínas (Fig. 25). No entanto, diferenças quanto à intensidade das bandas foram observadas, sendo a proteína SPAD1 expressa em maior concentração nas frações eluídas, conforme indicado pela maior intensidade das bandas em comparação à BSP5.

1284

1285

1286

1287

1288

1289

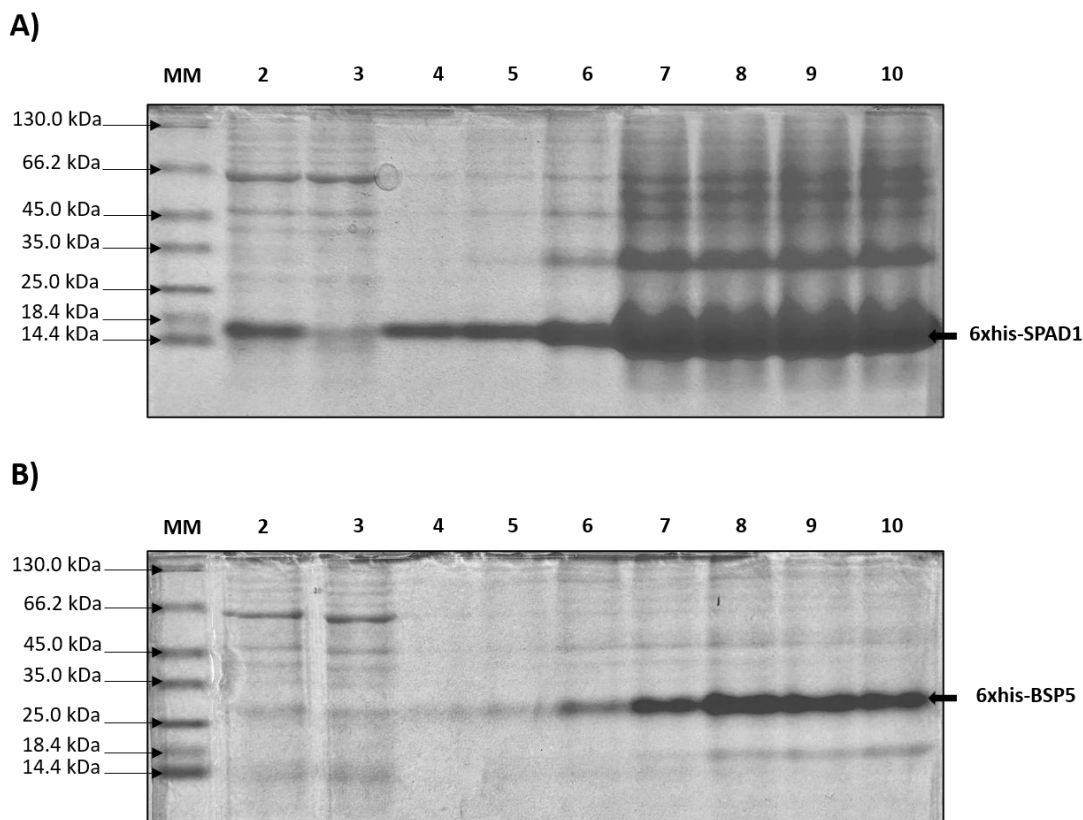
1290

Nas amostras controle (sem purificação), ambas as proteínas apresentaram um perfil com múltiplas bandas no gel, indicando a presença de diversas proteínas. Após a purificação, observou-se uma redução significativa das bandas nas frações não ligadas e de lavagem, sugerindo que a maior parte das proteínas recombinantes ficaram retidas na matriz cromatográfica. Esse resultado foi mais evidente nas canaletas 3 e 4, onde houve diminuição ou ausência das bandas específicas de interesse.

1291 As frações eluídas (correspondentes às canaletas 5 a 10) mostraram
 1292 recuperação eficaz das proteínas, com início da eluição observado a partir da
 1293 fração 6 e pico de intensidade a partir da fração 7 para ambas. Esse padrão,
 1294 semelhante entre SPAD1 e BSP5, indica que o sistema de purificação funcionou
 1295 de forma eficiente. No entanto, a purificação de SPAD1 resultou em um perfil
 1296 mais limpo e com maior concentração da proteína alvo, enquanto a BSP5
 1297 apresentou bandas com menor intensidade, o que pode indicar menor expressão
 1298 ou perda parcial durante o processo. A presença de algumas bandas
 1299 inespecíficas em determinadas frações pode estar relacionada a fatores como
 1300 sobrecarga da coluna ou contaminação residual de purificações anteriores.
 1301 Ainda assim, as bandas com posicionamento e intensidade compatíveis com as
 1302 proteínas recombinantes, destacadas por setas nas imagens correspondentes,
 1303 indicam a recuperação eficiente das proteínas recombinantes SPAD1 e BSP5.

1304
 1305
 1306

Figura 25. Eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida da purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de SPAD1 e BSP5.



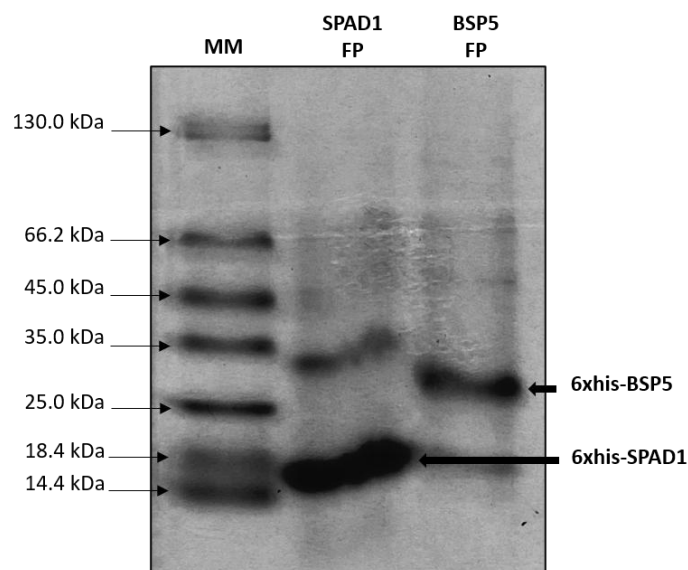
1307
 1308
 1309
 1310

A) SPAD1 - canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: proteínas filtradas sem purificação; canaleta 3: proteínas não ligadas; canaleta 4: fração de lavagem; canaleta 5: fração 6; canaleta 6: fração 7; canaleta 7: fração 8; canaleta 8: fração 9; canaleta 9: fração 10; canaleta 10: fração

1311 11. **B)** BSP5 - canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: proteínas filtradas sem purificação;
 1312 canaleta 3: proteínas não ligadas; canaleta 4: fração de lavagem; canaleta 5: fração 6; canaleta
 1313 6: fração 7; canaleta 7: fração 8; canaleta 8: fração 9; canaleta 9: fração 10; canaleta 10: fração
 1314 11. **MM:** Marcador molecular com intervalo de 14,4 a 130 kDa. As setas indicam as bandas de
 1315 SPAD1 e BSP5.
 1316

1317 A análise em gel SDS-PAGE das frações de pico combinadas (frações 7
 1318 a 15), obtidas após a purificação por cromatografia de afinidade das proteínas
 1319 recombinantes SPAD1 e BSP5, apresentou resultados compatíveis com os
 1320 perfis observados nas eletroforeses anteriores. Nas canaletas 2 e 3,
 1321 correspondentes às amostras combinadas de SPAD1 e BSP5, respectivamente,
 1322 é possível observar uma banda intensa e bem definida na posição esperada para
 1323 o peso molecular teórico de cada proteína. Esse padrão indica que as proteínas
 1324 recombinantes foram recuperadas em boa concentração e reforça a eficiência
 1325 do processo de purificação, uma vez que praticamente não há bandas adicionais
 1326 interferindo nos resultados (Fig. 26).

1327 **Figura 26.** Eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida da purificação por
 1328 cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de SPAD1 e BSP5.
 1329



1330
 1331
 1332 Canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: frações de pico unidas de F7 a F15 de SPAD1.
 1333 Canaleta 3: frações de pico unidas de F7 a F15 de BSP5. **MM:** Marcador molecular com intervalo
 1334 de 14.4 a 130 kDa. As setas mostram as bandas referentes às proteínas SPAD1 e BSP5.

1335

1336 5.4.6 Quantificação por Qubit

1337

1338

1339

1340

1341

1342

1343

1344

1345

1346

1347

1348

1349

1350

1351

1352

1353

1354

Na quantificação das frações F2 a F16 de SPAD1 e BSP5, obtidas após a purificação, foram obtidas concentrações máximas de 3,060 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (fração F11) para SPAD1 e 1,590 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (fração F9) para BSP5 (Tab. 5). Esses valores são consideravelmente menores quando comparados àqueles obtidos na quantificação inicial por Bradford, que indicavam 18,032 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para SPAD1 e 21,129 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para BSP5. Essa diferença sugere que boa parte das proteínas presentes nas amostras antes da purificação não correspondia às proteínas recombinantes de interesse, mas sim a contaminantes e outras proteínas bacterianas.

A redução nos valores após a purificação confirma a eficácia da cromatografia de afinidade na remoção desses componentes indesejados, resultando em amostras mais puras. Isso acontece devido à ligação específica entre a cauda de histidina (His-tag), adicionada às proteínas recombinantes, e os íons metálicos imobilizados na matriz, restando apenas as proteínas de interesse (Bornhorst et al., 2000).

Tabela 5. Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) nas frações purificadas de SPAD1 e BSP5.

SPAD1		BSP5	
Fração	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Fração	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
F2	0,484	F2	0,378
F3	0,438	F3	0,282
F4	2,274	F4	0,308
F5	0,442	F5	0,220
F6	0,618	F6	0,630
F7	1,330	F7	0,572
F8	2,040	F8	0,912
F9	2,400	F9	1,590
F10	2,820	F10	1,170
F11	3,060	F11	0,988
F12	2,460	F12	0,490
F13	1,430	F13	0,554
F14	1,820	F14	0,636

F15	0,932	F15	0,418
F16	0,812	F16	0,386

1355
1356

1357 Após a quantificação individual das frações eluídas (F7 a F15) de SPAD1
1358 e BSP5, apenas aquelas correspondentes ao pico de eluição foram agrupadas
1359 em pools específicos para cada proteína, resultando em volumes finais de 8,5
1360 mL para SPAD1 e 9 mL para BSP5. Em seguida, foi realizada nova quantificação
1361 dessas amostras em duplicata, considerando-se a média dos valores obtidos
1362 (Tab. 6).

1363 A quantificação dos pools revelou uma média de 24,480 mg de proteína
1364 total para SPAD1 e 9,594 mg para BSP5. Esses valores foram calculados com
1365 base na concentração média ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das duplicatas, multiplicada pelo respectivo
1366 volume final de cada amostra. Em contraste com os resultados obtidos na análise
1367 de Bradford antes da purificação (Tab. 4), observou-se um rendimento final
1368 superior para SPAD1 em comparação a BSP5. Esse resultado corrobora os
1369 dados obtidos durante a purificação, na qual o pico de eluição da SPAD1 se
1370 manteve constante até sua estabilização, indicando uma eluição completa e
1371 contínua. Por outro lado, na purificação da BSP5, embora o pico inicial tenha se
1372 mantido por algum tempo, foram observados múltiplos picos subsequentes,
1373 sugerindo a possível presença de impurezas residuais ou diferentes isoformas
1374 da proteína.

1375

1376 **Tabela 6.** Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dos pools de SPAD1 e BSP5.

SPAD1		BSP5	
Duplicata	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Duplicata	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1	2,340	1	0,952
2	3,420	2	1,180

1377

1378 Os rendimentos obtidos neste estudo para as proteínas recombinantes
1379 SPAD1 e BSP5, após purificação, foram superiores aos relatados em alguns
1380 trabalhos anteriores. No trabalho realizado por Villamizar (2022), a expressão de
1381 SPAD1 em *E. coli* Arctic Express resultou em concentração final de apenas 0,06
1382 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, também em CI, valor significativamente inferior ao observado na fração

1383 F11 deste trabalho. Bustamante Filho et al. (2018) também conseguiram
1384 expressar a proteína recombinante SPAD1 (aSFP) em *E. coli* cepa BL21,
1385 utilizando o vetor pET-23a(+), alcançando bons rendimentos após purificação
1386 por cromatografia de afinidade. Assim como neste trabalho, esse estudo
1387 comprova que é possível obter quantidades suficientes dessas biomoléculas
1388 para análises funcionais e aplicações na criopreservação.

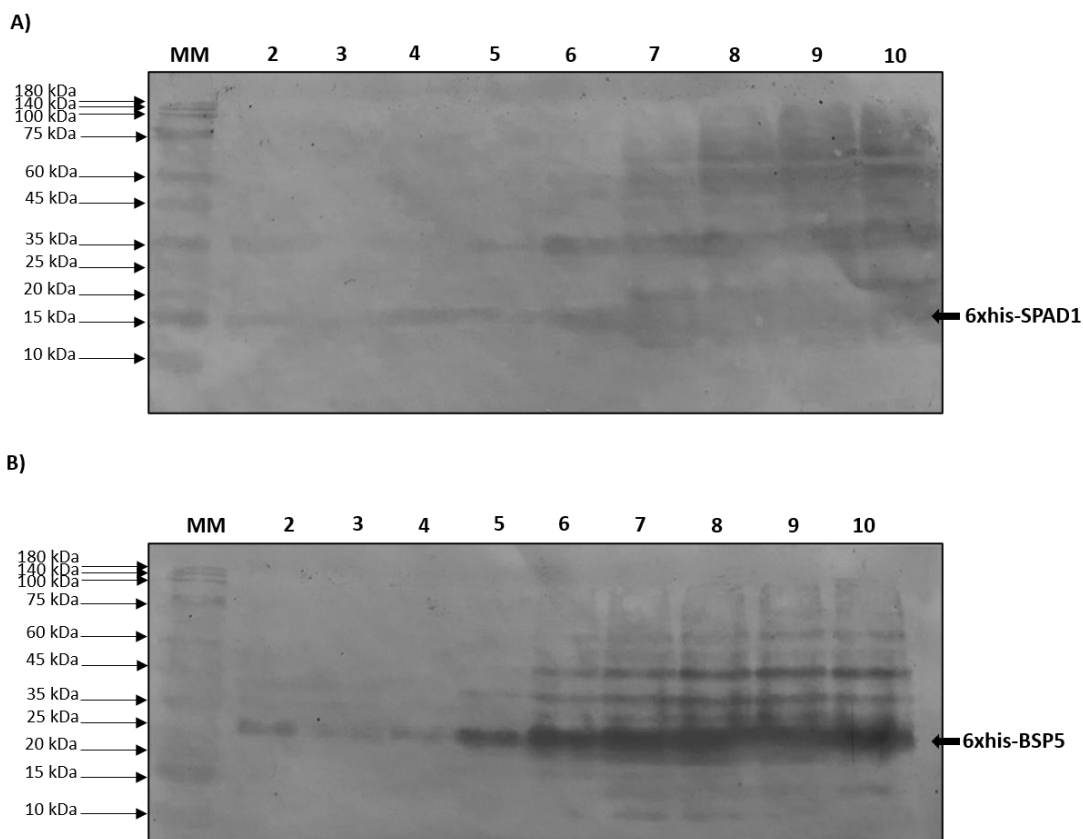
1389 O rendimento final obtido após a purificação confirmou a recuperação
1390 eficiente das proteínas recombinantes. Considerando as quantificações finais, a
1391 SPAD1 apresentou um rendimento total de 24,480 mg, enquanto a BSP5 atingiu
1392 9,594 mg. Esses valores refletem o sucesso do processo de purificação e
1393 demonstram que foi possível obter quantidades expressivas de ambas as
1394 proteínas para as etapas posteriores do estudo, mostrando a efetividade do
1395 sistema de expressão e do protocolo adotado.

1396

1397 **5.4.7 Western blotting**

1398 A imunomarcagem específica das proteínas de interesse, observada nas
1399 posições correspondentes às suas massas moleculares teóricas (15,37 kDa para
1400 SPAD1 e 21,07 kDa para BSP5), confirma os resultados obtidos nas análises
1401 anteriores e reforça a identidade das proteínas recombinantes após a
1402 purificação, tanto na avaliação individual das frações eluídas quanto no *pool* das
1403 frações de pico (F7 a F15) (Fig. 27 e 28). No entanto, apesar de a
1404 imunomarcagem do *pool* ter sido realizada corretamente, a baixa intensidade do
1405 sinal na membrana dificultou a obtenção de uma imagem de boa qualidade para
1406 registro fotográfico.

1407 **Figura 27.** Western blotting da purificação de por cromatografia de afinidade das proteínas
 1408 recombinantes SPAD1 e BSP5.



1409

1410

1411

1412 **A)** SPAD1 - canaleta 1: Marcador molecular; canaleta 2: proteínas filtradas sem purificação;

1413 canaleta 3: proteínas não ligadas; canaleta 4: fração de lavagem; canaleta 5: fração 6; canaleta

1414 6: fração 7; canaleta 7: fração 8; canaleta 8: fração 9; canaleta 9: fração 10; canaleta 10: fração

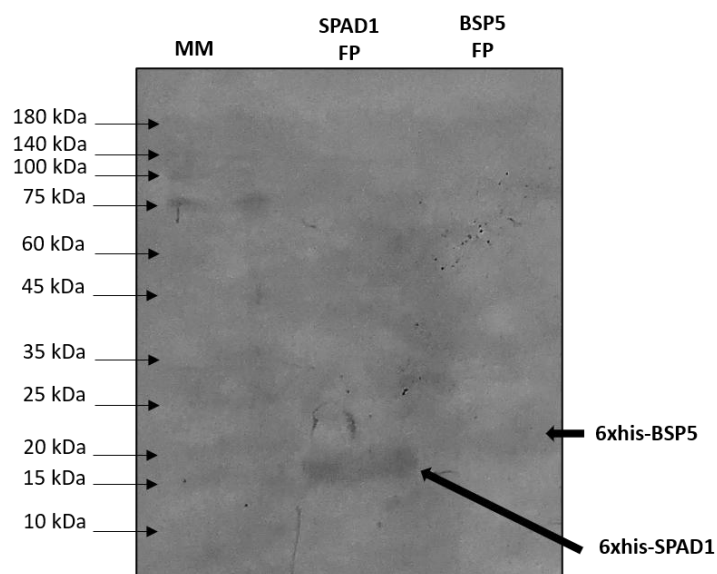
1415 11. **B)** BSP5 - canaleta 1: Marcador molecular; canaleta 2: proteínas filtradas sem purificação;

1416 canaleta 3: proteínas não ligadas; canaleta 4: fração de lavagem; canaleta 5: fração 6; canaleta

6: fração 7; canaleta 7: fração 8; canaleta 8: fração 9; canaleta 9: fração 10; canaleta 10: fração

1417 11. **MM**: Marcador molecular com intervalo de 10 a 180 kDa. As setas indicam as bandas
 1418 referentes a SPAD1 e BSP5.

1419 **Figura 28**: Western blotting da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas
 1420 recombinantes SPAD1 e BSP5 obtidas a partir do corpo de inclusão.



1421

1422

1423 Canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: frações de pico unidas de F7 a F15 de SPAD1;

1424 canaleta 3: frações de pico unidas de F7 a F15 de BSP5. **FP**: Frações de pico. **MM**: Marcador

1425 molecular com intervalo de 10 a 180 kDa. **Obs.:** Algumas regiões da membrana estão menos

1426 visíveis devido ao desbotamento parcial ao longo do tempo, o que dificultou o registro. As setas

1427 indicam as bandas referentes a SPAD1 e BSP5.

1428 **6 CONCLUSÃO GERAL**

1429

1430 Os resultados obtidos neste estudo apresentam uma metodologia eficiente
1431 para a clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal
1432 bovino com potencial aplicação na criopreservação de sêmen, especialmente de
1433 animais com baixa criotolerância. A partir da recuperação das sequências de
1434 aminoácidos das proteínas de interesse no banco de dados UniProt, foi possível
1435 clonar com sucesso os genes das proteínas BSP5, SPAD1 e OPN, todas
1436 associadas à fertilidade e à proteção espermática durante o processo de
1437 criopreservação.

1438 A expressão heteróloga dessas proteínas em *E. coli*, por meio do vetor
1439 plasmidial pET-28a(+), permitiu a produção recombinante de BSP5 e SPAD1 de
1440 forma satisfatória. As etapas de purificação por cromatografia de afinidade,
1441 resultaram em quantidades adequadas e padrões de eluição consistentes,
1442 especialmente para a proteína SPAD1, cuja estabilidade sugere bom potencial
1443 para aplicações funcionais. Embora a purificação da BSP5 tenha apresentado
1444 múltiplos picos de eluição, indicando possíveis impurezas ou isoformas, os níveis
1445 obtidos foram promissores.

1446 Em contraste, a produção recombinante da OPN revelou limitações,
1447 provavelmente relacionadas à ausência de modificações pós-traducionais no
1448 sistema de expressão bacteriano. Nesse sentido, novos experimentos que
1449 explorem diferentes condições e sistemas de expressão são cruciais para
1450 otimizar a obtenção desta proteína recombinante.

1451 De forma geral, nossos resultados demonstram que as técnicas utilizadas no
1452 experimento foram satisfatórias para a produção das proteínas recombinantes
1453 SPAD1 e BSP5, as quais são relatadas por seu importante papel na proteção
1454 dos espermatozoides durante a criopreservação.

7 REFERÊNCIAS

- ABAD, M. et al. Effect of insemination–ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 4, p. 418-422, 2007.
- ABEDI, D. et al. Optimization of the Expression of Genes Encoding Poly (3-hydroxyalkanoate) Synthase from *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310 in *Escherichia coli*. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 47, 2012.
- ABUZEID, W. M.; LI, D.; O'MALLEY JR, B. W. Gene therapy for head and neck cancer. **Advances in Oto-Rhino-Laryngology**, v. 70, p. 141-151, 2011.
- AL DOGHAITHER, H.; GULL, M. Plasmids as genetic tools and their applications in ecology and evolution. In: **Plasmid**. IntechOpen, 2019.
- ALVAREZ-GALLARDO, H. et al. Gamete therapeutics: recombinant protein adsorption by sperm for increasing fertility via artificial insemination. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65083, 2013.
- BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 393-401, 2003.
- BAILEY, J. L. et al. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1251-1259, 2008.
- BARTH, A. D. et al. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University Press, 1989.
- BARUSELLI, P. S. et al. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558-571, 2017.
- BASS, J. J. et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 27, n. 1, p. 4-25, 2017.
- BELVAL, L. et al. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express. **Protein Expression and Purification**, v. 109, p. 29-34, 2015.

BERGERON, A. et al. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 4, p. 461-470, 2005.

BHATWA, A. et al. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 630551, 2021.

BORK, P.; BECKMAN, G. 1993. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. **Journal of Molecular Biology**, 231:539–545.

BOULEFTOUR, W. et al. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology— Contribution of mouse experimental genetics. **Matrix Biology**, v. 52, p. 60- 77, 2016.

BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 2000. p. 245-254.

BOWER, D. M.; PRATHER, K. L. J. Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid DNA. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 805-813, 2009.

BRADFORD, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248–254.

BUSTAMANTE-FILHO, I. C. et al. Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 2, p. 96-103, 2018.

CABALLERO, I. et al. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1352-1355, 2008.

CABALLERO, I. et al. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 12-21, 2012.

CALVETE, J. J. et al. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 407, p. 201–206, 1997.

- CATALÁN, J. et al. Seminal plasma antioxidants are related to sperm cryotolerance in the horse. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, p. 1279, 2022.
- CHART, H. et al. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 α and EQ1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 1048-1058, 2000.
- CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 59, n. 4, p. 451-458, 2001.
- CHOI, J. H.; LEE, S. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 625-635, 2004.
- CHOI, Y. J. et al. Novel, Versatile, and Tightly Regulated Expression System for *Escherichia coli* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 15, p. 5058-5066, 2010.
- CODOGNOTO, V. et al. Functional insights into the role of seminal plasma proteins on sperm motility of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 195, p. 251-258, 2018.
- DE ASSUMPÇÃO, T. I. et al. Perfil de proteínas e açúcares do plasma seminal e sua relação com os parâmetros andrológicos de touros da raça nelore. **Biosci Journal**, v. 29, p. 940-945, 2013.
- DE AZEVEDO VIANA, A. G. et al. Functional attributes of seminal proteins in bull fertility: a systematic review. **Reproduction**, v. 161, n. 4, p. 459-475, 2021.
- DE AZEVEDO VIANA, A. G. et al. Seminal proteoforms from bulls with contrasting semen freezability: a story deciphered by top-down mass spectrometry. **Reproduction**, v. 169, n. 2, 2025.
- DE BRABANDER, P. et al. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: a review. **Biotechnology Advances**, v. 64, p. 108121, 2023.
- DE LAZARI, F. L. et al. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility and morphology in boars. **Andrologia**, v. 51, n. 4, p. e13222, 2019.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DENHARDT, D. T. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas, May 10–12, 2002. **Calcified Tissue International**, v. 74, p. 213-219, 2004.

DENHARDT, D. T.; GUO, X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 15, p. 1475-1482, 1993.

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 37, n. 1, p. 203-206, 2004.

ELBING, K. L.; BRENT, R. Recipes and tools for culture of *Escherichia coli*. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 125, n. 1, p. e83, 2019.

ERIKSON, D. W. et al. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, v. 133, n. 5, p. 909-917, 2007.

EVANS, H. C. et al. Lipidomic markers of sperm cryotolerance in cattle. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 20192, 2020.

FAKRUDDIN, M. et al. Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant *E. coli*. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, n. 1, p. 590587, 2013.

FERRER-MIRALLES, N. et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1-8, 2009.

FEUGANG, J. M. et al. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 3, p. 312-324, 2010.

FRANZEN, A.; HEINEGÅRD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochemical Journal**, v. 232, n. 3, p. 715-724, 1985.

FRASER, L.; STRZEŻEK, J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 3-4, p. 317-329, 2007.

FREIGASSNER, M.; PICHLER, H.; GLIEDER, A. Tuning microbial hosts for membrane protein production. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1-22, 2009.

GASTEIGER, Elisabeth et al. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: **The proteomics protocols handbook**. Totowa, NJ: Humana press, 2005. p. 571-607.

GIFRE, L. et al. Trends in recombinant protein use in animal production. **Microbial Cell Factories**, v. 16, p. 1-17, 2017.

GOMES, F. P. et al. Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14661, 2020.

GRÖTTER, L. G. et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post - thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 4, p. 655-665, 2019.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1089-1098, 2016.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 396-410, 2005.

HAYAT, S. M. G. et al. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 6, p. 718-725, 2018.

HENG, N. et al. RhoA improves cryopreservation of rooster sperm through the Rho/RhoA-associated kinase/cofilin pathway. **Poultry Science**, v. 101, n. 10, p. 102051, 2022.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000.

HOLT, W. V.; DEL VALLE, I.; FAZELI, A. Heat shock protein A8 stabilizes the bull sperm plasma membrane during cryopreservation: Effects of breed, protein concentration, and mode of use. **Theriogenology**, v. 84, n. 5, p. 693-701, 2015.

HULEANI, S. et al. *Escherichia coli* como hospedeira de expressão de anticorpos para a produção de proteínas diagnósticas: significado e

expressão. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 756-773, 2022.

HUNTER, G. K. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. **Calcified Tissue International**, v. 93, n. 4, p. 348-3354, 2013.

HUSSAIN, H. et al. Use of a protein engineering strategy to overcome limitations in the production of "Difficult to Express" recombinant proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2348-2359, 2017.

HUSSAIN, H.; MALDONADO-AGURTO, R.; DICKSON, A. J. The endoplasmic reticulum and unfolded protein response in the control of mammalian recombinant protein production. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 1581-1593, 2014.

ITAKURA, K. et al. Expressão em *Escherichia coli* de um gene sintetizado quimicamente para o hormônio somatostatina. **Ciência**, v. 198, n. 4321, p. 1056-1063, 1977.

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 143-172, 2000.

JOHNSON, L. A. et al. Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 615-624, 2005.

JOIS, P. S. et al. Functional characterization of the domains of the bovine binder of SPerm 5 (BSP5) protein. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, p. 1-11, 2015.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, p. 536-551, 2012.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 249-256, 2008.

KATILA, T.; KARESKOSKI, M. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. **Pferdeheilkunde**, v. 22, n. 2, p. 193, 2006.

KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 83-93, 2016.

KOSTYLEV, M. et al. Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 α -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. e0137466, 2015.

- KRAUS, M. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 1, p. 33-46, 2005.
- KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.
- KUMAR, P. et al. Seminal plasma proteome: promising biomarkers for bull fertility. **Agricultural Research**, v. 1, p. 78-86, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEDESMA, A. et al. Electroejaculation Increases Low Molecular Weight Proteins in Seminal Plasma Modifying Sperm Quality in Corriedale Rams. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 2, p. 324-332, 2014.
- LEDESMA, A. et al. Recombinant peptide reverses cryo-capacitation in ram sperm and improves *in vitro* fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 207, p. 61-72, 2019.
- LEDESMA, A. et al. Recombinant TrxAFNIIx4His 6 improves post-thaw motility of ram sperm measured by a sperm motility tracker software. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 1-6, 2021.
- LEE, E.; KIM, D. Effects of astaxanthin on miniature pig sperm cryopreservation. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 1, p. 6784591, 2018.
- LEMMA, A. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. **Artificial Insemination in Farm Animals**, v. 12, p. 191-216, 2011.
- LI, L. et al. Expression and purification of soluble recombinant β -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 244, 2022.
- LIMA, S. B. G. P. N. P. et al. Effect of high temperature on physiological parameters of Nelore (*Bos taurus indicus*) and Caracu (*Bos taurus taurus*) cattle breeds. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 5, p. 2233-2241, 2020.
- LOPES, M. B.; MARTINS, G.; CALADO, C. R. C. Kinetic modeling of plasmid bioproduction in *Escherichia coli* DH5 α cultures over different carbon-source compositions. **Journal of Biotechnology**, v. 186, p. 38-48, 2014.

MANJUNATH, P. et al. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 217, 2007.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 109-119, 2002.

MANN, T. et al. Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. **Male Reproductive Function and Semen: Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology**, 1-37, 1981a.

MANN, T. et al. Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. **Male Reproductive Function and Semen: Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology**, p. 1-37, 1981b.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology**. Springer Science & Business Media, 2012.

MORTARINO, M. et al. Two - dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 797-801, 1998.

MOURA, A. A.; MEMILI, E. Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. **Animal Reproduction (AR)**, v. 13, n. 3, p. 191-199, 2018.

MOURA, A. A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, 2007.

MOURA, A. A. et al. 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, p. 201-211, 2006.

MÜHLMANN, M. et al. Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 220, 2017.

NIELSEN, M. K. et al. Life-cycle, total-industry genetic improvement of feed efficiency in beef cattle: Blueprint for the Beef Improvement Federation. **The Professional Animal Scientist**, v. 29, n. 6, p. 559-565, 2013.

PENCE, Mel et al. Improving reproductive efficiency through the use of reproductive tract scoring in a group of beef replacement heifers. **The Bovine Practitioner**, p. 35-40, 2007.

PÉREZ-PATIÑO, C. et al. New in-depth analytical approach of the porcine seminal plasma proteome reveals potential fertility biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v. 17, n. 3, p. 1065-1076, 2018.

PERIS-FRAU, P. et al. Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2781, 2020.

PILLAI, H. et al. Effect of supplementation of recombinant Regucalcin in extender on cryopreservation of spermatozoa of water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 11, p. 1133-1139, 2017.

PLANTE, G.; MANJUNATH, P. Epididymal Binder of SPERM genes and proteins: what do we know a decade later? **Andrology**, v. 3, n. 5, p. 817-824, 2015.

PLANTE, G. et al. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. **Cell and Tissue Research**, v. 363, p. 105-127, 2016.

POTTS, R. J.; NOTARIANNI, L. J.; JEFFERIES, T. M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 447, n. 2, p. 249-256, 2000.

QADEER, S. et al. Efficiency of beetle (*Dendroides canadensis*) recombinant antifreeze protein for buffalo semen freezability and fertility. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1662-1669, 2016.

QI, X.-L. et al. Comparative transcriptome analysis digs out genes related to antifreeze between fresh and frozen–thawed rooster sperm. **Poultry Science**, v. 99, n. 6, p. 2841-2851, 2020.

REGO, J. P. A. et al. Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in Guzerat bulls. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 12, p. 5308-5320, 2016.

REGO, J. P. A. et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 148, n. 1-2, p. 1-17, 2014.

- RITTLING, S. R.; CHAMBERS, A. F. Role of osteopontin in tumour progression. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 10, p. 1877-1881, 2004.
- ROCA, J. et al. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 79-83, 2011.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. et al. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 84, n. 1, p. 57-65, 2010.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; WALLGREN, M. Advances in boar semen cryopreservation. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, n. 1, p. 396181, 2011.
- RODRÍGUEZ-VILLAMIL, P. et al. 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, n. 3, p. 540-554, 2016.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.
- ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412-1422, 2019.
- ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 508-516, 2013.
- RUEDA, F. et al. Production of functional inclusion bodies in endotoxin-free *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9229-9238, 2014.
- SA, Madrid KUBUS. **Manual de inseminación artificial porcina**. Kubus SA, 1993.
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, p. 249-264, 2008.

SIITERI, J. E. et al. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. **Molecular Reproduction and Development, Malden**, v. 40, p. 16-28, 1995.

SILVA, F.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2571-2580, 2012.

SOLEILHAVOUP, C. et al. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v.109, p.245-260, 2014.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113-128, 2005.

SOUZA, C. E. A. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1-2, p. 72-89, 2008.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. ProtParam tool. Disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>. Acesso em: 22 jan. 2024.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 211-222, 2006.

TÖPFER-PETERSEN, E. et al. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v. 30, n. 4-5, p. 217-224, 1998.

TUTTLE, A. R.; TRAHAN, N. D.; SON, M. S. Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. **Current Protocols**, v. 1, n. 1, p. e20, 2021.

TVRDÁ, E. et al. Impact of seminal chemical elements on the oxidative balance in bovine seminal plasma and spermatozoa. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 125096, 2013.

UGUR, M. R. et al. Advances in cryopreservation of bull sperm. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 268, 2019.

VIANA, A. G. A. et al. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16323, 2018.

VIANA, A. G. A. et al. Contributions of seminal plasma proteins to fertilizing ability of bull sperm: A meta-analytical review. **Andrologia**, v. 54, n. 11, p. e14615, 2022.

VILLAMIZAR, A. P. B. **Producción de Proteínas Recombinantes del Plasma Seminal Bovino de Interés en Procesos de Criopreservación Espermática**. Tipo de documento: Tese. UNIVERSIDAD DE PAMPLONA, 2022.

WABERSKI, D. et al. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. **Theriogenology**, v. 137, p. 2-7, 2019.

WEI, L. (2024). Exploring the Functional Potential of Plasmids in Genetic Research. **Advances in Genetic Engineering**, 13:307.

WURM, F.; BERNARD, A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 156-159, 1999.

YESTE, M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 71-79, 2015.

ZALAZAR, L. et al. Heterologous recombinant protein with decapacitating activity prevents and reverts cryodamage in ram sperm: an emerging biotechnological tool for cryobiology. **Animal Reproduction Science**, v. 164, p. 31-39, 2016.

ZALAZAR, L. et al. Recombinant SPINK3 improves ram sperm quality and *in vitro* fertility after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 144, p. 45-55, 2020.