

Fecundação

Uma visão bioquímica das principais proteínas envolvidas

Grazieli Cristina Ramiro
Renato Massaharu Hassunuma
Patrícia Carvalho Garcia
Sandra Heloísa Nunes Messias



© Renato Massaharu Hassunuma.

Conselho Editorial

BIOMÉDICA KELLY COLUSSI PINHEIRO PRECIPITO

Especialista em Reprodução Humana Assistida pela Associação Instituto Sapientiae

PROF.^A DR.^A DANIELA PEREIRA CATANZARO

Doutora em Ciências, área de concentração: Biologia Oral pela Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) - Universidade de São Paulo (USP)

Capa e Design

Renato Massaharu Hassunuma

Crédito da figura da capa, contracapa e páginas capitulares

Wedding Rings, Gold, Wedding, Love, no people, love [Internet]. 2017 Jan 15 [acesso 2020 abr 05]. Disponível em: <https://www.peakpx.com/624685/wedding-rings-gold-wedding-love-no-people-love>. License to use Creative Commons Zero - CC0. Figura registrada como domínio público.

CIP – Brasil. Catalogação na Publicação

R1739f

Fecundação – Uma visão bioquímica das principais proteínas envolvidas / Grazieli Cristina Ramiro, Renato Massaharu Hassunuma, Patrícia Carvalho Garcia e Sandra Heloísa Nunes Messias. - Bauru: Canal 6 Editora, 2020.

Inclui bibliografia

82 f. : il. color.

ISBN: 978-65-86030-43-3

1. Fertilização. 2. Interações espermatozoide-óvulo. 3. Bioquímica. I. Ramiro, Grazieli Cristina. II. Hassunuma, Renato Massaharu. III. Garcia, Patrícia Carvalho. IV. Messias, Sandra Heloísa Nunes. V. Título

CDU: 612.613

Fecundação

Uma visão bioquímica das principais proteínas envolvidas

GRAZIELI CRISTINA RAMIRO

Aluna de Graduação do Curso de Biomedicina
Universidade Paulista – UNIP
Campus Bauru

RENATO MASSAHARU HASSUNUMA

Professor Titular do Curso de Biomedicina
Universidade Paulista – UNIP
Campus Bauru

PATRÍCIA CARVALHO GARCIA

Coordenadora Auxiliar do Curso de Biomedicina
Universidade Paulista – UNIP
Campus Bauru

SANDRA HELOÍSA NUNES MESSIAS

Coordenadora Geral do Curso de Biomedicina
Universidade Paulista – UNIP

canal6 editora

1ª Edição / 2020
Bauru, SP





Sumário

Apresentação	13
1. Izumo 1 e Juno	14
1.1. Estrutura da Izumo 1	15
1.2. Estrutura da Juno	18
1.3. Interações entre Izumo 1 e Juno	21
2. Acrosina	25
3. SLLP1 e SAS1B	30
4. CD9, $\alpha 6\beta 1$, ADAM 2 e PSG17	33
6. CD46	34
5. CD81	35
7. Espermadesinas	38
7.1. Espermadesinas PSP-I e PSP-II	39
8. Sp18	42
9. PKDREJ	45
10. SPAM1	46
11. Zonadesina	47
12. ZPs	48
12.1. ZP1	49
12.2. ZP2	52
12.3. ZP3	55
13. CRISP1 e 2	58
Créditos das figuras	59
Referências	61



Agradecimentos

Pelo apoio no desenvolvimento deste livro digital e em projetos do Curso de Biomedicina da UNIP – Bauru agradecemos:

Prof. Aziz Kalaf Filho,
Diretor da Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru,

Prof. Dr. Paschoal Laércio Armonia,
Diretor do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista - UNIP

Pelas valiosas correções e contribuições na revisão deste material e das análises bioquímicas, agradecemos a **Biomédica Kelly Colussi Pinheiro Precipito** e a **Prof.^a Dr.^a Daniela Pereira Catanzaro**.

Nossos agradecimentos também a você, leitor, nossa principal inspiração!

*Grazieli Cristina Ramiro,
Prof. Dr. Renato Massaharu Hassunuma,
Prof.^a Dr.^a Patrícia Carvalho Garcia e
Prof.^a Dr.^a Sandra Heloísa Nunes Messias.*



Fecundação

Uma visão bioquímica das principais proteínas envolvidas





Apresentação

Este livro foi concebido como um material multidisciplinar de apoio pedagógico no processo de ensino-aprendizagem de Bioquímica Estrutural, Embriologia e Reprodução Humana. São apresentadas as funções de algumas das principais proteínas presentes em espermatozoides e ovócitos envolvidas no processo de fecundação. A estrutura bioquímica de algumas delas são apresentadas utilizando o programa de simulação computacional de biomoléculas RasMol 2.7.4.2.

Para realizar estas análises foram utilizados arquivos PDB obtidos gratuitamente no site **Protein Data Bank** (Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Os códigos apresentados (PDBids) no texto referem-se aos arquivos PDB utilizados para produzir as imagens no software RasMol.

A partir da seleção dos arquivos PDB, foi utilizado o programa computacional **RasMol 2.7.4.2** para o desenvolvimento de programações que produziram as imagens apresentadas no livro. Este software pode ser obtido gratuitamente no site Home Page for RasMol and OpenRasMol (Disponível em: <http://www.openrasmol.org/>). O RasMol permite a utilização de diferentes comandos interativos por meio da Janela RasMol Command Line. Mais informações sobre os comandos utilizados neste programa podem ser encontrados no Manual do RasMol (Disponível em: <http://www.csb.yale.edu/userguides/graphics/rasmol/rasmol.pdf>).

1. Izumo 1 e Juno

A Izumo 1 é uma proteína expressa exclusivamente na membrana plasmática da região do acrossomo de espermatozoides maduros. Foi descoberta em 2005 pelos pesquisadores japoneses Naokazu Inoue, Masahito Ikawa, Ayako Isotani e Masaru Okabe. A denominação desta proteína foi uma homenagem ao santuário xintoísta japonês de mesmo nome, onde muitos casamentos são celebrados (Inoue, Ikawa, Isotani, Okabe, 2005).

A proteína Juno, também conhecida como Receptor de Folato 4 ou Izumo1R, é expressa na superfície da membrana plasmática de ovócitos II. Foi descoberta em 2014, por Enrica Bianchi, Brendan Doe, David Goulding e Gavin J. Wright, pesquisadores do *Welcome Sanger Institute*, na Inglaterra. Seu nome foi dado em homenagem a uma deusa romana da fertilidade e casamento (Bianchi, Doe, Goulding, Wright, 2014).

A interação entre as proteínas Izumo 1 do espermatozoide com a Juno do ovócito II ocorre durante o processo de fecundação. Além de desempenhar função durante a união dos gametas, esta interação também é importante para prevenir a poliespermia. O estudo destas proteínas poderá ser importante no desenvolvimento de novos anticoncepcionais não hormonais com menos efeitos adversos (Bianchi, Wright, 2014).

1.1. Estrutura da Izumo 1

A Izumo 1 é uma proteína transmembrana presente na região do acrossomo do espermatozoide, capaz de interagir com a proteína Juno do ovócito (Nishimura, Han, Bianchi, Wright, de Sanctis, Jovine, 2016; Satouh, Inoue, Ikawa, Okabe, 2012).

Possui 377 resíduos de aminoácidos, com uma grande região extracelular, uma única região transmembrana e uma cauda citoplasmática curta (Inoue, Hamada, Kamikubo, Hirata, Kataoka, Yamamoto et al., 2013).

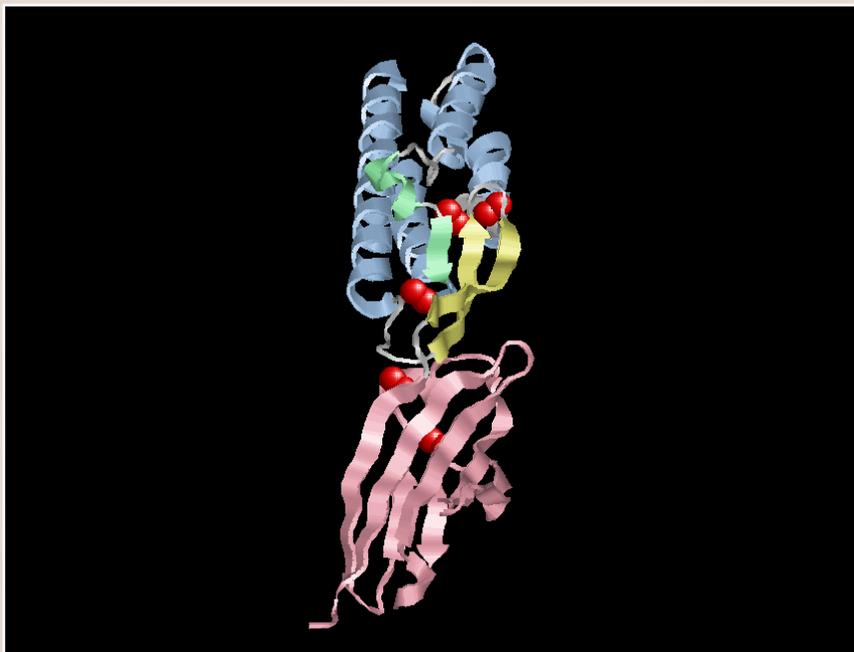
A estrutura de sua região extracelular é formada por:

- **Feixe de quatro alfa-hélices:** formado pelos resíduos de aminoácidos 27-44, 47-62, 80-99, 104-133;
- **Grampo beta:** que consiste em duas fitas betas paralelas constituídas pelos resíduos 141-148 e 153-160;
- **Região intermediária:** formada por uma alfa-hélice (resíduos 70-75) e uma fita beta (resíduos 77-79);
- **Domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina:** formado pelos resíduos 164-256, onde são observadas duas alfa-hélices e sete fitas beta.

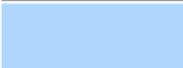
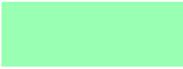
Algumas regiões da molécula são estabilizadas por meio de ligações dissulfeto, formadas pela interação entre cinco pares de átomos de enxofre (Nishimura, Han, Bianchi, Wright, de Sanctis, Jovine, 2016).

Na figura 1, observa-se a Izumo 1 de camundongo (*Mus musculus*). Esta figura foi desenvolvida a partir do arquivo 5B5K.pdb. A molécula é representada no modo *Cartoons*. O feixe de quatro alfa-hélices é representado em azul matiz (*bluetint*), o grampo beta em amarelo matiz (*yellowtint*), a região intermediária em verde matiz (*greentint*) e o domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina em rosa matiz (*pinktint*). Os cinco pares de átomos de enxofre que participam das ligações dissulfeto estão representadas no modo *Spacefill* em vermelho (*red*). No quadro 1, é apresentada a programação desenvolvida para o software RasMol.

Figura 1 – Estrutura da Izumo 1



Legenda de cores

Estrutura	Cor	Amostra de cor
Feixe de quatro alfa-hélices	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Grampo beta	Amarelo matiz (<i>yellowtint</i>)	
Região intermediária	Verde matiz (<i>greentint</i>)	
Domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina	Rosa matiz (<i>pinktint</i>)	
Pares de átomos de enxofre	Vermelho (<i>red</i>)	

Quadro 1 - Script desenvolvido para a estrutura da Izumo 1

```
load 5b5k.pdb
wireframe off
cartoons
select 27-44, 47-62, 80-99, 104-133
colour bluetint
select 141-148, 153-160
colour yellowtint
select 70-75, 77-79
colour greentint
select 164-256
colour pinktint
select cys.sg
spacefill
colour red
rotate y 180
rotate z 90
zoom 130
```

1.2. Estrutura da Juno

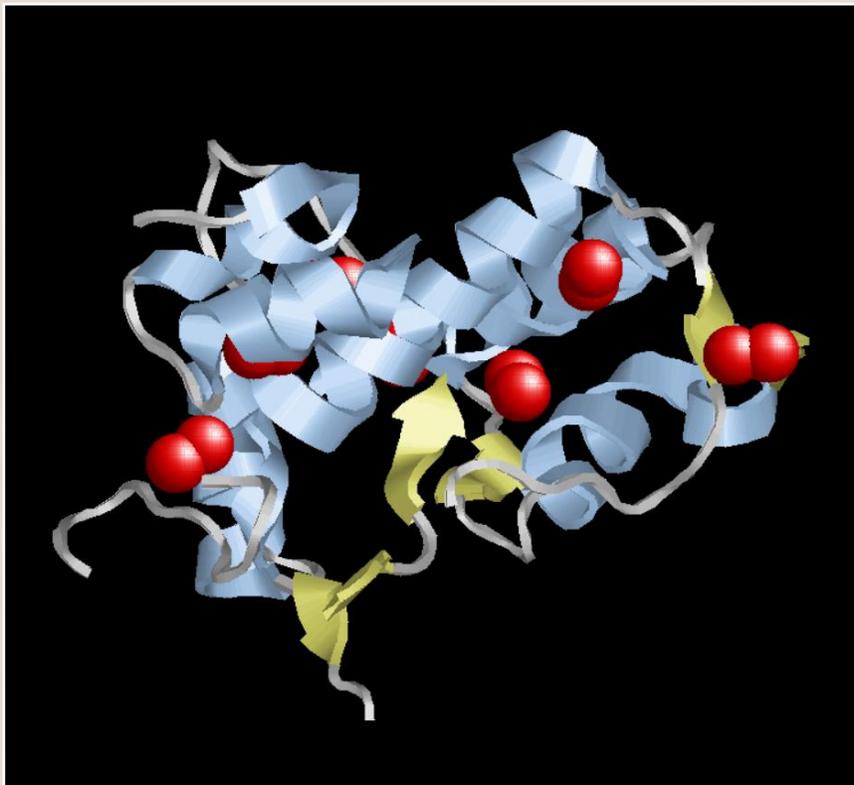
A Juno, também conhecida como Receptor de Folato 4 ou Izumo1R, é uma proteína presente na superfície dos óvulos e é codificada pelo gene *FOLR4* (Kato, Satouh, Nishimasu, Kurabayashi, Morita, Fujihara et al., 2016). Possui 221 resíduos de aminoácidos e sua estrutura é formada por:

- **Nove alfa-hélices:** constituídas pelos resíduos de aminoácidos 44-51, 57-66, 83-100, 101-104, 126-137, 169-173, 175-183, 194-198, 212-223;
- **Seis fitas beta:** constituídas pelos resíduos de aminoácidos 107-108, 119-120, 123-125, 141-142, 167-168, 188-190.

Algumas regiões da molécula são estabilizadas por meio de ligações dissulfeto, formadas pela interação entre 7 pares de átomos de enxofre (Han, Nishimura, Al Hosseini, Bianchi, Wright, Jovine, 2015).

Na figura 2, observa-se a proteína Juno de camundongo (*Mus musculus*). Esta figura foi desenvolvida a partir do arquivo 5EJN.pdb. A molécula é representada no modo *Cartoons*. As alfa-hélices são representadas em azul matiz (*bluetint*), as fitas beta em amarelo matiz (*yellowtint*) e os 14 átomos de enxofre que participam das ligações dissulfeto estão no modo *Spacefill* em vermelho (*red*). No quadro 2, é apresentada a programação desenvolvida para o software RasMol.

Figura 2 – Estrutura da Juno



Legenda de cores

Estrutura	Cor	Amostra de cor
Alfa-hélices	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Fitas beta	Amarelo matiz (<i>yellowtint</i>)	
Pares de átomos de enxofre	Vermelho (<i>red</i>)	

Quadro 2 - Script desenvolvido para a estrutura da Juno

```
load 5ejn.pdb
wireframe off
cartoons
select 44-51, 57-66, 83-100, 101-104, 126-137, 169-173, 175-183,
194-198, 212-223
colour bluetint
select 107-108, 119-120, 123-125, 141-142, 167-168, 188-190
colour yellowtint
select cys.sg
spacefill
colour red
select *b
cartoons off
spacefill off
select cys143.s?
spacefill off
rotate y 70
translate x -8
translate y -17
zoom 250
```

1.3. Interações entre Izumo 1 e Juno

As interações entre as três regiões da Izumo 1 (feixe de quatro alfa-hélices, região intermediária e domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina) e Juno ocorrem por meio de ligações do tipo: forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e aromáticas, pontes salinas intermoleculares e ligações de hidrogênio. Todas estas interações são separadas por um espaço de 3 Å, sugerindo que sejam de natureza fraca.

Participam destas interações entre Izumo 1 e Juno:

- **Feixe de quatro hélices da Izumo 1:** leucina 69, ácido glutâmico 71, metionina 75, glicina 76 e valina 77;
- **Região intermediária da Izumo 1:** tirosina 134, valina 141, leucina 146, triptofano 148, lisina 150, asparagina 151, lisina 153, ácido glutâmico 155, valina 156, histidina 157, alanina 158, arginina 160, lisina 161, serina 162, tirosina 163;
- **Domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina da Izumo 1:** asparagina 239 e serina 241;
- **Juno:** tirosina 44, ácido glutâmico 45, leucina 58, triptofano 62, histidina 65, leucina 66, fenilalanina 77, histidina 78, cisteína 79, glicina 80, leucina 81, metionina 83, prolina 84, arginina 87, isoleucina 91, metionina 145, tirosina 147, lisina 163, cisteína 172 (Aydin, Sultana, Sheng Li, Thavalingam, Lee, 2016).

Nas figuras 3 e 4, observam-se os resíduos de aminoácidos que participam das interações entre Izumo 1 e Juno humanas. Estas figuras foram desenvolvidas a partir do arquivo 5F4E.pdb. A Izumo 1 é representada no modo *Cartoons* em azul matiz (*bluetint*) e a Juno no modo *Cartoons* em rosa matiz (*pinktint*). Os resíduos do feixe de quatro hélices, da região intermediária e do domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina da Izumo 1 que participam da interação com a Juno estão representados no modo *Spacefill*, respectivamente em branco (*white*), azul celeste (*skyblue*) e azul (*blue*). Os resíduos da Juno, que participam da interação com a Izumo 1 estão representados em rosa (*pink*). No quadro 3, é apresentada a programação desenvolvida para visualização das figuras 3 e 4 para o software RasMol.

Figura 3 – Resíduos que interagem entre Izumo 1 e Juno



Legenda de cores

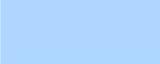
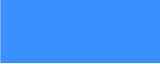
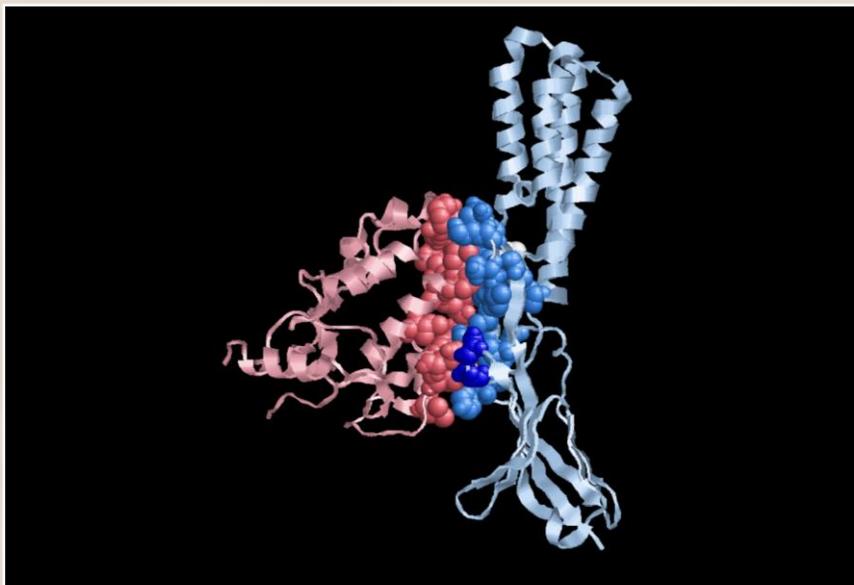
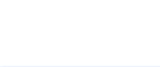
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Izumo 1	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Resíduos do feixe de 4 hélices	Branco (<i>white</i>)	
Resíduos da região intermediária	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	
Resíduos do domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina	Azul (<i>blue</i>)	
Juno	Rosa matiz (<i>pinktint</i>)	
Resíduos da Juno	Rosa (<i>pink</i>)	

Figura 4 – Resíduos que interagem entre Izumo 1 e Juno



Legenda de cores

Estrutura	Cor	Amostra de cor
Izumo 1	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Resíduos do feixe de 4 hélices	Branco (<i>white</i>)	
Resíduos da região intermediária	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	
Resíduos do domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina	Azul (<i>blue</i>)	
Juno	Rosa matiz (<i>pinktint</i>)	
Resíduos da Juno	Rosa (<i>pink</i>)	

Quadro 3 - Script desenvolvido para resíduos que interagem entre Izumo 1 e Juno

```
load 5f4e.pdb
wireframe off
cartoons
select *a
colour bluetint
select *b
colour pinktint
select 69a, 71a, 75-77a
spacefill
colour white
select 134a, 141a, 146a, 148a, 150-151a, 153a, 155-158a, 160-163a
spacefill
colour skyblue
select 239a, 241a
spacefill
colour blue
select 44-45b, 58b, 62b, 65-66b, 77-84b, 87b, 91b, 145b, 147b,
163b, 172b
spacefill
colour pink
rotate x 50
rotate z 90
zoom 120
pause
rotate y 180
```

2. Acrosina

A acrosina é encontrada no acrossomo de espermatozoides em sua forma inativa, a proacrosina, uma serina protease. Durante a fecundação, ocorre a sua ativação, quando desempenha diferentes funções como: participar da liberação das enzimas acrossômicas (Trander, Read, Jones, Brady, 2000), atuar como receptor para proteínas da zona pelúcida (Crosby, Barros, 1999; Gaboriau, Howes, Clark, Jones, 2007; Trander, Read, Jones, Brady, 2000) e facilitar a penetração do espermatozoide no ovócito, por meio de sua ação proteolítica (Trander, Read, Jones, Brady, 2000).

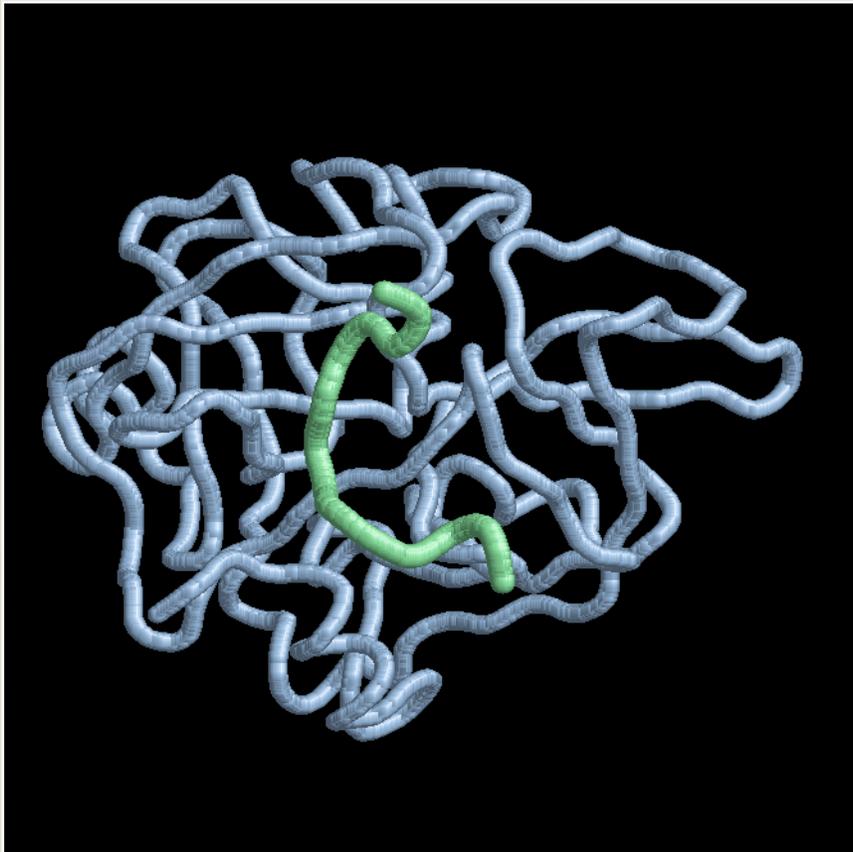
A acrosina é formada estruturalmente por uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Seu sítio ativo é formado pelos resíduos de aminoácidos histidina 57, ácido aspártico 102 e serina 195, que conjuntamente são denominados tríade catalítica. Além disso, a acrosina possui dois sítios de ligação secundários denominados exosítios I e II (Trander, Read, Jones, Brady, 2000).

Na figura 5, observa-se a acrosina de ovelha (*Ovis aries*). Esta figura foi desenvolvida a partir do arquivo 1FIW.pdb. A cadeia leve, formada pelos resíduos 3 a 16, está representada no modo *Trace 200* em verde matiz (*greentint*) e a cadeia pesada, formada pelos resíduos 16 a 254, é representada no modo *Trace 150* em azul matiz (*bluetint*).

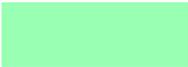
Na figura 6, são observados a tríade catalítica e os exosítios da acrosina, a partir do arquivo 1FIW.pdb. As cadeias leve e pesada estão representadas respectivamente no modo *Trace 200* em verde matiz (*greentint*) e no modo *Trace 150* em azul matiz (*bluetint*). Os resíduos 57, 102 e 195 da tríade catalítica são representados no modo *Spacefill*, respectivamente, em vermelho alaranjado (*redorange*), vermelho (*red*) e amarelo matiz (*yellowtint*). Os exosítios I e II são representados no modo *Spacefill*, respectivamente, em azul celeste (*skyblue*) e azul (*blue*).

As programações desenvolvidas para visualização das figuras 5 e 6 no software RasMol são apresentadas, respectivamente, nos quadros 4 e 5.

Figura 5 – Estrutura da acrosina



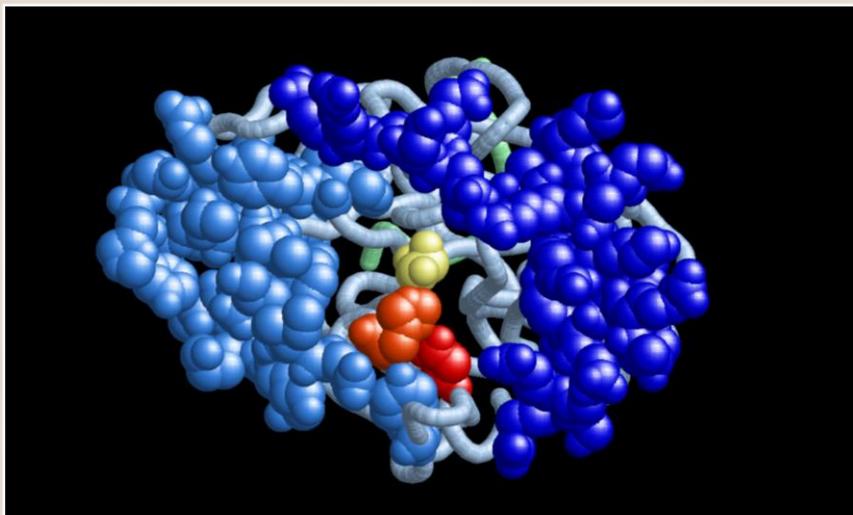
Legenda de cores

Estrutura	Cor	Amostra de cor
Cadeia leve	Verde matiz (<i>greentint</i>)	
Cadeia pesada	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	

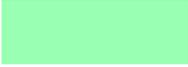
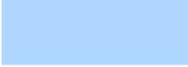
Quadro 4 - Script desenvolvido para estrutura da acrosina

```
load 1fiw.pdb
wireframe off
trace 200
select *l
colour greentint
select *a
colour bluetint
rotate y 200
trace 150
zoom 150
```

Figura 6 – Tríade catalítica e exosítios da acrosina



Legenda de cores

Estrutura	Cor	Amostra de cor
Cadeia leve	Verde matiz (<i>greentint</i>)	
Cadeia pesada	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Resíduo 57 da tríade catalítica	Vermelho alaranjado (<i>redorange</i>)	
Resíduo 102 da tríade catalítica	Vermelho (<i>red</i>)	
Resíduo 195 da tríade catalítica	Amarelo matiz (<i>yellowtint</i>)	
Exosítio I	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	
Exosítio II	Azul (<i>blue</i>)	

Quadro 5 - Script desenvolvido para tríade catalítica e exosítios da acrosina

```
load 1fiw.pdb
wireframe off
trace 200
select *l
colour greentint
select *a
colour bluetint
select 57
spacefill
colour redorange
select 102
spacefill
colour red
select 195
spacefill
colour yellowtint
select 35-40, 60-65, 87,94
spacefill
colour skyblue
select 145-150, 170-178, 186-188, 220-225
spacefill
colour blue
select hoh176
spacefill off
select hoh64
spacefill off
rotate x 25
rotate y 15
zoom 150
```

3. SLLP1 e SAS1B

A proteína associada à membrana espermática (SLLP1, do inglês *Sperm Lysozyme-Like Protein 1*) se liga ao seu receptor presente no ovócito, a SAS1B (do inglês *Sperm Acrosomal SLLP1 Binding*), também conhecida como ovastacina (Herrero, Mandal, Digilio, Coonrod, Maier, Herr, 2005; Sachdev, Mandal, Mulders, Digilio, Panneerdoss, Suryavathi, 2012; Zheng, Mandal, Shumilin, Chordia, Panneerdoss, Herr et al., 2015).

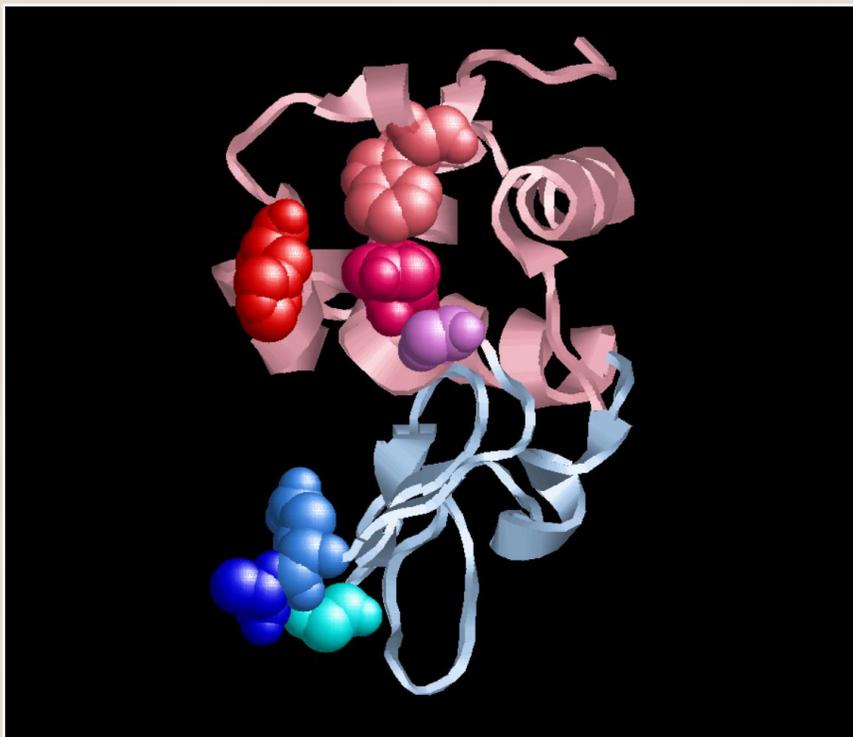
A SLLP1 está presente na membrana plasmática de espermatozoides, formando um polímero com o formato de um filamento que lembra um pequeno arpão. Esta proteína ajuda o espermatozoide a se fixar na parede do ovócito, favorecendo o processo de fecundação (Zheng, Mandal, Shumilin, Chordia, Panneerdoss, Herr et al., 2015).

A estrutura da SLLP1 é formada por:

- **Domínio I:** formado pelos resíduos de aminoácidos 1 a 38 e 87 a 129;
- **Domínio II:** formado pelos resíduos de aminoácidos 39 a 86;
- **Sítio ativo de interação com a SAS1B:** formado pelos resíduos de aminoácido tirosina 33, glicina 37, ácido glutâmico 46, alanina 47, glicina 49, histidina 113 e triptofano 122.

Na figura 7, observa-se a estrutura bioquímica da SLLP1 de camundongo (*Mus musculus*). Esta figura foi desenvolvida a partir do arquivo 4YF2.pdb. Os domínios I e II estão representados no modo *Cartoons* em rosa matiz (*pinktint*) e azul matiz (*bluetint*), respectivamente. Os resíduos da SLLP1 que interagem com a SAS1B estão apresentados no modo *Spacefill*, sendo a tirosina 33 representada em rosa quente (*hotpink*), a glicina 37 em violeta (*violet*), o ácido glutâmico 46 em azul celeste (*skyblue*), a alanina 47 em azul (*blue*), a glicina 49 em ciano (cyan), a histidina 113 em vermelho (red) e o triptofano 122 em rosa (*pink*). A programação desenvolvida para visualização da figura 7 no software RasMol está apresentada no quadro 6.

Figura 7 – Estrutura da SLLP1



Legenda de cores

Estrutura	Cor	Amostra de cor
Domínio I	Rosa matiz (<i>pinktint</i>)	
Domínio II	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Tirosina 33	Rosa quente (<i>hotpink</i>)	
Glicina 37	Violeta (<i>violet</i>)	
Ácido glutâmico 46	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	
Alanina 47	Azul (<i>blue</i>)	
Glicina 49	Ciano (<i>cyan</i>)	
Histidina 113	Vermelho (<i>red</i>)	
Triptofano 122	Rosa (<i>pink</i>)	

Quadro 6 - Script desenvolvido para a estrutura da SLLP1

```
load 4yf2.pdb
wireframe off
select *a
cartoons
select 1-38a, 87-129a
colour pinktint
select 39-86a
colour bluetint
select tyr33a
spacefill
colour hotpink
select gly37a
spacefill
colour violet
select glu46a
spacefill
colour skyblue
select ala47a
spacefill
colour blue
select gly49a
spacefill
colour cyan
select his113a
spacefill
colour red
select trp122a
spacefill
colour pink
rotate x 100
rotate z 160
zoom 300
translate y -5
translate x 5
```

4. CD9, $\alpha 6\beta 1$, ADAM 2 e PSG17

A CD9 corresponde a um membro da família das tetraspaninas, que são proteínas transmembrana de baixo peso molecular (20-50 kD) que possuem quatro domínios que atravessam a membrana plasmática (por isso sua denominação) (Stipp, Kolesnikova, Hemler, 2003). As tetraspaninas estão envolvidas em diferentes processos de adesão celular, motilidade, proliferação, diferenciação e sinalização celular (Zhu, Miller, Boucheix, Rubinstein, Liu, Hynes et al., 2002)

O papel da CD9 no processo de fecundação não foi completamente elucidado, mas foi observado que a inativação de gene CD9 permite a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e a ligação à membrana plasmática do ovócito II, porém as membranas plasmáticas dos gametas não conseguem se fundir (Springate, Frasier, 2017; Stipp, Kolesnikova, Hemler, 2003; Zhu, Miller, Boucheix, Rubinstein, Liu, Hynes et al., 2002).

A CD9 é capaz de se ligar a várias integrinas $\beta 1$, incluindo a $\alpha 6\beta 1$, presente em ovócitos, a qual por sua vez também é capaz de interagir com a glicoproteína ADAM-2 (do inglês *Disintegrin and Metalloprotease 2*, também conhecida como fertilina β), presente na superfície de espermatozoides (Chen, Sampson, 1999; Evans, 2001). Pesquisadores sugerem que a CD9 atue neste sentido, facilitando a ligação da $\alpha 6\beta 1$ com a ADAM 2 (Chen, Tung, Coonrod, Takahashi, Bigler, Chang et al., 1999).

A CD9 também atua como receptor para a imunoglobulina PSG17, a qual por sua vez é capaz de se ligar ao ovócito e inibir a fusão dos gametas. Assim sendo, a CD9 parece desempenhar um papel na fusão do espermatozoide com o ovócito, por meio de sua interação com a PSG17 e impedindo a sua ligação ao gameta feminino (Ellerman, Ha, Primakoff, Myles, Dveksler, 2003).

5. CD46

A CD46, assim como a CD9, é um membro das tetraspaninas (Lozahic, Christiansen, Manié, Gerlier, Billard, Boucheix et al., 2000). Esta proteína, também conhecida como proteína cofator de membrana (MCP), é uma das proteínas reguladoras do sistema complemento. Esta proteína é capaz de interagir com vários patógenos que infectam células humanas. Inicialmente, foi descoberta como uma proteína capaz de se ligar às proteínas C3b e C4b do sistema complemento (Liszewski, Kemper, Price, Atkinson, 2005).

Vários fatores sugerem a importância da CD46 no processo de fecundação: 1) sua presença na membrana interna acrossomal (Liszewski, Kemper, Price, Atkinson, 2005) e também em ovócitos (Taylor, Biljan, Kingsland, Johnson, 1994); 2) sua participação no processo de regulação da reação acrossômica (Inoue, Ikawa, Nakanishi, Matsumoto, Nomura, Seya et al., 2003); 3) seu envolvimento na estabilização da membrana acrossomal (Johnson, Clift, Andrlíkova, Jursova, Flanagan, Cummerston, 2007; Klinovska, Sebkova, Dvorakova-Hortova, 2014); 4) anormalidades desta proteína em pacientes com infertilidade idiopática (Kitamura, Matsumiya, Yamanaka, Takahara, Hara, Matsumoto et al., 1997).

6. CD81

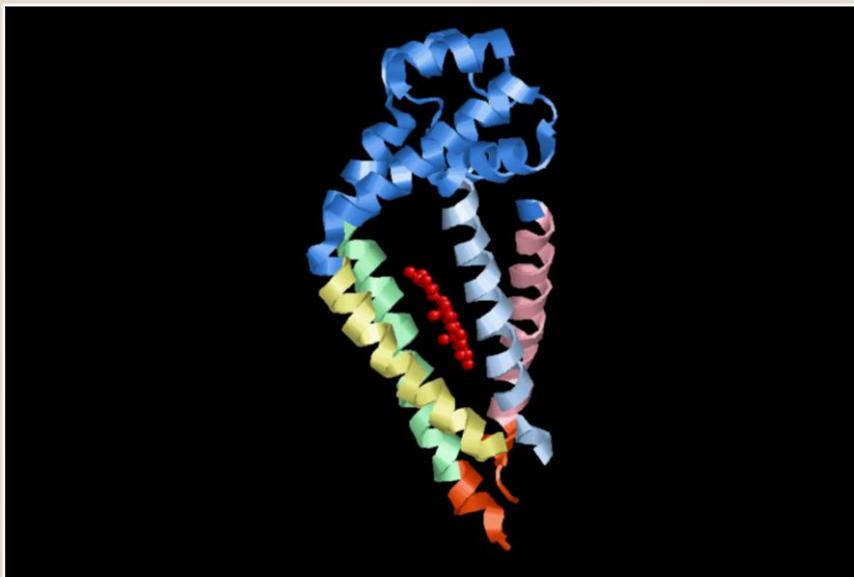
A CD81, assim como a CD9 e a CD46, corresponde a um outro membro da família das tetraspaninas (Klinovska, Sebkova, Dvorakova-Hortova, 2014). É conhecida também como TAPA-1 (Target of Antiproliferative Antibody-1) ou tspan28. Esta tetraspanina é expressa na superfície de ovócitos e desempenha papel no sistema imune, geniturinário e auditivo (Zimmerman, Kelly, McMillan, Seegar, Dror, Kruse, 2016), estando presente na superfície de diversas células do corpo, exceto hemácias e plaquetas (Levy, Todd, Maecker, 1998).

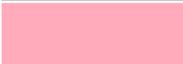
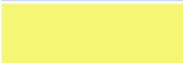
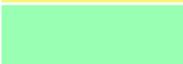
A CD81 é uma proteína transmembrana que possui como estrutura secundária apenas alfa-hélices. As quatro alfa-hélices que atravessam a membrana plasmática são denominadas TM1, TM2, TM3 e TM4 (a abreviatura TM é utilizada devido ao fato desta região caracterizar a área transmembrana). Uma parte da molécula está localizada no meio extracelular e outra no interior do citoplasma. A região interna do conjunto das quatro alfa-hélices que atravessam a membrana interagem com uma molécula de colesterol (Zimmerman, Kelly, McMillan, Seegar, Dror, Kruse, 2016).

Na figura 8, observa-se a estrutura bioquímica da CD81 humana. Esta figura foi desenvolvida a partir do arquivo 5TCX.pdb. A CD81 está representada no modo *Cartoons* em rosa matiz (*pinktint*), sendo a região transmembrana da TM1 (formada pelos resíduos de aminoácidos 13 a 34) representados em rosa matiz (*pinktint*), a região transmembrana da TM2 (resíduos 58 a 84) em azul matiz (*bluetint*), a região transmembrana da TM3 (resíduos 91 a 112) em amarelo matiz (*yellowtint*) e a região transmembrana da TM4 (resíduos 2020 a 225) em verde matiz (*greentint*). A região extracelular (resíduos 35 a 57 e 113-201), está representada em azul celeste (*skyblue*) e a região intracelular (resíduos 1 a 12, 85 a 90 e 226 a 236) em vermelho alaranjado (*redorange*). Uma molécula de colesterol presente no centro das quatro alfa-hélices transmembrana está representada no modelo de bolas e varetas (*Spacefill 200* e *Wireframe 100*) em vermelho (*red*).

A programação desenvolvida para visualização da figura 8 no software RasMol esta apresentada no quadro 7.

Figura 8 – Estrutura da CD81



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Região transmembrana da TM1	Rosa matiz (<i>pinktint</i>)	
Região transmembrana da TM2	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Região transmembrana da TM3	Amarelo matiz (<i>yellowtint</i>)	
Região transmembrana da TM4	Verde matiz (<i>greentint</i>)	
Região extracelular	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	
Região intracelular	Vermelho alaranjado (<i>redorange</i>)	
Colesterol	Vermelho (<i>red</i>)	

Quadro 7 - Script desenvolvido para a estrutura da CD81

```
load 5tcx.pdb
wireframe off
cartoons
select 35-57, 113-201
colour skyblue
select 1-12, 85-90, 226-236
colour redorange
select 13-34
colour pinktint
select 58-84
colour bluetint
select 91-112
colour yellowtint
select 202-225
colour greentint
select clr
spacefill 200
wireframe 100
colour red
rotate x -70
rotate y -80
```

7. Espermedesinas

As espermedesinas são proteínas produzidas por glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino e presentes no esperma que são capazes de se ligar à superfície do espermatozoide. Correspondem a uma família de proteínas com uma diversidade de membros: AWN-1, AWN-2, AQN-1, AQN-2, AQN-3, PSP-I e PSP-II e suas isoformas glicosiladas. No momento da ejaculação, as espermedesinas formam uma capa protetora ao redor do acrossomo, prevenindo uma possível reação acrossômica prematura. Durante a capacitação espermática, parte dessas proteínas são perdidas, mas algumas permanecem como receptores para a zona pelúcida, contribuindo assim para a ligação e reconhecimento entre o espermatozoide e o ovócito (Dostàlovà, Calvete, Sanz, Töpfer-Petersen, 1994; Haase, Schlötterer, Hundrieser, Kuiper, Distl, Töpfer-Petersen et al., 2005; Töpfer-Petersen, Romero, Varela, Ekhlasi-Hundrieser, Dostàlovà, Sanz et al., 1998).

As espermedesinas possuem um domínio denominado CUB com estrutura secundária formada apenas por folhas beta (Dostàlovà, Calvete, Sanz, Töpfer-Petersen, 1994; Haase, Schlötterer, Hundrieser, Kuiper, Distl, Töpfer-Petersen et al., 2005; Töpfer-Petersen, Romero, Varela, Ekhlasi-Hundrieser, Dostàlovà, Sanz et al., 1998). O domínio CUB corresponde a um motivo estrutural de aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos presentes em proteínas extracelulares e associadas à membrana plasmática, presentes em diferentes células de várias espécies animais (CUB, 2020). A sigla CUB foi dada em referência às três proteínas onde foi primeiramente observada: subcomponentes do sistema complemento (C1r e C1s), proteína embrionária do ouriço do mar (Uegf) e proteína morfogenética óssea 1 (Bmp1) (Bork, Beckmann, 1993; Töpfer-Petersen, Romero, Varela, Ekhlasi-Hundrieser, Dostàlovà, Sanz et al., 1998).

7.1 Espermadesinas PSP-I e PSP-II

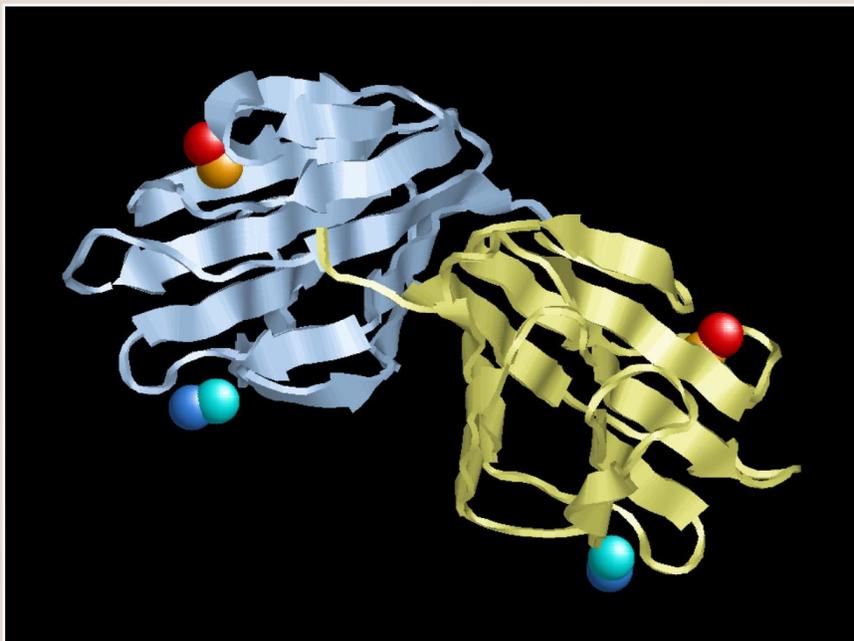
As espermadesinas PSP-I e PSP-II são proteínas produzidas por glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino de suínos. A sigla PSP refere-se ao termo em inglês *porcine seminal proteins*, ou seja, proteínas do plasma seminal de suínos (Kwok, Yang, Dai, Soares, Chen, McMurtry, 1993; Yang, Kwok, Leshin, Bollo, Li, 1998).

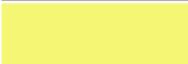
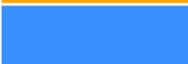
As PSP-I e PSP-II também são observadas no javali (*Sus scrofa*), formando um heterodímero com 112 e 116 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Cada uma das proteínas é formada por 10 fitas beta organizadas em um motivo estrutural denominado sanduíche beta. Cada sanduíche beta é formado por duas folhas beta formadas pelas fitas 1, 3, 5, 8, 10 e 2, 4, 6, 7, 9. Cada folha beta é formada por duas fitas beta paralelas (1, 3 e 2, 4) e quatro fitas beta antiparalelas (3, 5, 8, 10 e 4, 6, 7, 9). Pontes dissulfeto são observadas entre átomos de enxofre dos resíduos de cisteína 9, 30 e 53, 74 (Romero, Romão, Varela, Kölln, Dias, Carvalho et al., 1997).

As espermadesinas PSP-I e PSP-II de javalis apresentam sítios de ligação para glicoproteínas da zona pelúcida. Entretanto, a fraca ligação deste dímero com a superfície do espermatozoide e a sua remoção durante a capacitação *in vitro* podem indicar que estas proteínas não sejam relevantes na interação entre os gametas (Calvete, Mann, Schäfer, Raida, Sanz, Töpfer-Petersen, 1995).

Na figura 9, observa-se a estrutura bioquímica do dímero PSP-I e PSP-II de javali (*Sus scrofa*). Esta figura foi desenvolvida a partir do arquivo 1SPP.pdb. As proteínas PSP-I e PSP-II estão representadas no modo *Cartoons* em amarelo matiz (*yellowtint*) e azul matiz (*bluetint*), respectivamente. Os átomos de enxofre dos resíduos de cisteína 9, 30, 53 e 74 estão representados no modo *Spacefill* em vermelho (*red*), laranja (*orange*), azul celeste (*skyblue*) e ciano (*cyan*), respectivamente. A programação desenvolvida para visualização da figura 9 no software RasMol esta apresentada no quadro 8.

Figura 9 – Estrutura das espermadésinas PSP-I e PSP-II



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
PSP-I	Amarelo matiz (<i>yellowtint</i>)	
PSP-II	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Átomos de enxofre da cisteína 9	Vermelho (<i>red</i>)	
Átomos de enxofre da cisteína 30	Laranja (<i>orange</i>)	
Átomos de enxofre da cisteína 53	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	
Átomos de enxofre da cisteína 74	Ciano (<i>cyan</i>)	

Quadro 8 - Script desenvolvido para a estrutura das espermedesinas
PSP-I e PSP-II

```
load 1spp.pdb
wireframe off
cartoons
select *a
colour yellowtint
select *b
colour bluetint
select cys9.sg
spacefill
colour red
select cys30.sg
spacefill
colour orange
select cys53.sg
spacefill
colour skyblue
select cys74.sg
spacefill
colour cyan
rotate x 10
rotate y -5
rotate z 80
translate y -3
zoom 180
```

8. Sp18

A Sp18 é uma proteína presente no espermatozoide com peso molecular de 18kDa (por isso, sua denominação) (Kresge, Vacquier, Stout, 2001). Também é conhecida como proteína acrossômica M_r 18,000 (Vacquier, Carner, Stout, 1990). Está presente na membrana que recobre o acrossomo, onde participa mediando a fusão da membrana plasmática do espermatozoide e do ovócito (Kresge, Vacquier, Stout, 2001).

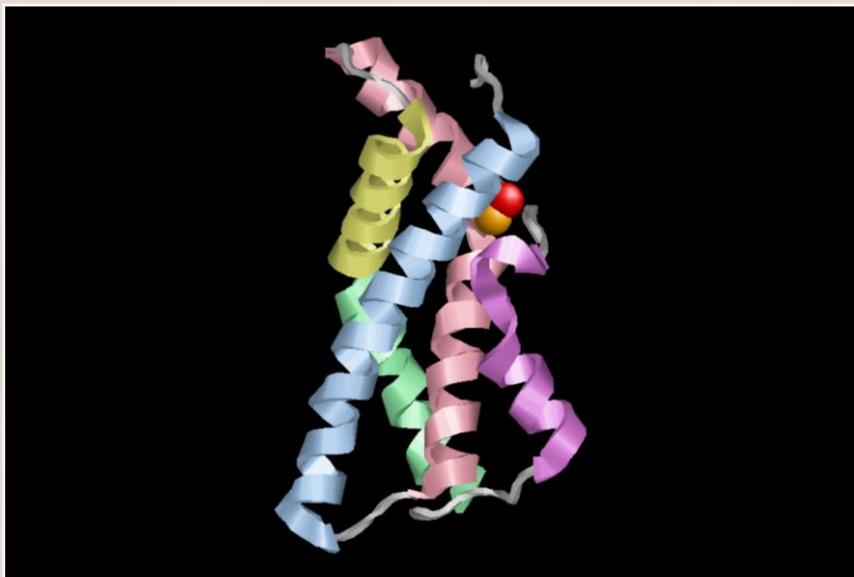
Assim como as espermedesinas PSP-I e PSP-II, a Sp18 não foi observada em humanos. Entretanto, foi observada em bovinos (Gou, Shang, An, Lin, Ren, Chen, 1998) e moluscos (Kresge, Vacquier, Stout, 2001).

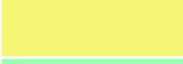
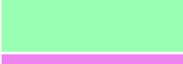
A estrutura secundária da Sp18 molusco abalone (*Haliotis fulgens*) é formada por cinco alfa-hélices, que correspondem a 70% da molécula e nenhuma fita beta. As alfa-hélices são formadas pelos resíduos de aminoácidos: alfa-hélice 1 (7-37), 2 (41-74), 3 (79-93), 4 (94-109) e 5 (118-132). As alfa-hélices 1 a 4 formam o núcleo da molécula e apresentam muitas áreas de contato entre si. Uma ponte dissulfeto existe entre átomos de enxofre dos resíduos cisteína 60 e cisteína 134, conectando a alfa-hélice 5 com a alfa-hélice 2 (Kresge, Vacquier, Stout, 2001).

Na figura 10, observa-se a estrutura da Sp18 do molusco abalone (*Haliotis fulgens*), desenvolvida a partir do arquivo 1GAK.pdb. A molécula está representada no modo *Cartoons*. As alfa-hélices 1, 2, 3, 4 e 5 estão representadas em azul matiz (*bluetint*), rosa matiz (*pinktint*), amarelo matiz (*yellowtint*), verde matiz (*greentint*) e violeta (*violet*), respectivamente. Os átomos de enxofre dos resíduos cisteína 60 e cisteína 134 que formam a ponte dissulfeto estão representados em laranja (*orange*) e vermelho (*red*), respectivamente.

A programação desenvolvida para visualização da figura 10 no software RasMol está apresentada no quadro 9.

Figura 10 – Estrutura da Sp18



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Alfa-hélice 1	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Alfa-hélice 2	Rosa matiz (<i>pinktint</i>)	
Alfa-hélice 3	Amarelo matiz (<i>yellowtint</i>)	
Alfa-hélice 4	Verde matiz (<i>greentint</i>)	
Alfa-hélice 5	Violeta (<i>violet</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 60	Laranja (<i>orange</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 134	Vermelho (<i>red</i>)	

Quadro 9 - Script desenvolvido para a estrutura da Sp18

```
load 1gak.pdb
wireframe off
cartoons
select 7-37
colour bluetint
select 41-74
colour pinktint
select 79-93
colour yellowtint
select 94-109
colour greentint
select 118-132
colour violet
rotate x 65
rotate y 20
rotate z 30
translate y 4
zoom 130
```

9. PKDREJ

A PKDREJ é uma proteína codificada por um membro da família de genes Policistina-1 e é expressa apenas na superfície de células da linhagem germinativa masculina (Sutton, Jungnickel, Florman, 2008). Sua designação refere-se ao fato deste gene possuir alta homologia com genes da família PKD (sendo que esta sigla refere-se à sua associação com a doença renal policística, e também com a formação canais de íons cálcio da membrana plasmática e interações intercelulares e entre células e a matriz extracelular) e o gene REJ (do inglês *receptor for egg jelly*, ou seja, um receptor presente em espermatozoides capaz de se ligar a componentes do citoplasma de ovócitos) (Springate, Frasier, 2017).

Um estudo desenvolvido por Sutton, Jungnickel e Florman (2008) utilizando PKDREJ mutante sugere que a proteína produzida por este gene participe da ligação do espermatozoide com a zona pelúcida, porém não sendo essencial para o processo de fertilização, nem para a reação acrossômica, mas parece controlar o processo de capacitação espermática, assim como favorecer o acesso do espermatozoide ao complexo ovócito-*corona radiata*.

Em 2015, um estudo desenvolvido por Vicens, Montoto, Couso-Ferrer, Sutton, Roldan sugeriu que a PKDREJ possa modular o momento da fertilização, regulando o transporte dos espermatozoides e a reação acrossômica. Assim sendo, a PKDREJ parece participar do processo de competição entre os espermatozoides durante a fecundação do ovócito.

10. SPAM1

A molécula de adesão de espermatozoides (SPAM1), também conhecida como PH-20 é um membro da família das hialuronidasas, é uma proteína presente na membrana plasmática da cabeça do espermatozoide (Sabeur, Cherr, Yudin, Primakoff, Li, Overstreet, 1997) e membrana interna do acrossomo (Cherr, Yudin, Overstreet, 2001).

Esta proteína participa do processo de fecundação por meio de mecanismos diferentes:

1. Sua atividade como hialuronidase permite que o espermatozoide atravesse a camada de células da *corona radiata*;
2. Possui uma atividade secundária ao permitir a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida (Cherr, Yudin, Overstreet, 2001; Hunnicutt, Primakoff, Myles, 1996; Sabeur, Cherr, Yudin, Primakoff, Li, Overstreet, 1997);
3. Desempenha papel no processo de maturação das células da linhagem germinativa masculina (Evans, Zhang, Martin-DeLeon, 2003).

Além das funções mencionadas acima, a SPAM1 também desempenha outras funções como a renovação do ácido hialurônico e renovação celular de células do trato genital feminino, sendo por isso, considerada uma proteína multifuncional (Zhang, Martin-DeLeon, 2003).

11. Zonadesina

A zonadesina (Zan) é uma proteína localizada na membrana externa do acrossomo de espermatozoides (Tardif, Cormier, 2011). Sua produção é iniciada pelos espermatócitos primários, sendo encontrada abundantemente em espermatídes e células de Sertoli (Lea, Sivashanmugam, O’Rand, 2001). Devido sua localização intracelular, esta proteína é exposta ao meio extracelular apenas durante o processo de capacitação espermática (Tardif, Wilson, Wagner, Hunt, Gertsenstein, Nagy, et al., 2010).

Sua estrutura sugere que seja uma proteína multifunção e que também participe da adesão do espermatozoide à zona pelúcida (Gasper, Swanson, 2006; Hardy, Garbers, 1995; Lea, Sivashanmugam, O’Rand, 2001; Tardif, Wilson, Wagner, Hunt, Gertsenstein, Nagy, et al., 2010).

12. ZPs

A zona pelúcida em humanos é composta por quatro glicoproteínas, nomeadas: ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4 (Goudet, Mugnier, Callebaut, Monget, 2008; Gupta, 2018; Gupta, Bansal, Ganguly, Bhandari, Chakrabarti, 2009; Izquierdo-Rico, Jiménez-Movilla, Llop, Pérez-Oliva, Ballesta, Gutiérrez-Gallego et al., 2009; Springate, Frasier, 2017).

As glicoproteínas ZP2, ZP3 e ZP4 também são conhecidas como ZPA, ZPC e ZPB, respectivamente (Goudet, Mugnier, Callebaut, Monget, 2008; Springate, Frasier, 2017).

Várias proteínas presentes em espermatozoides parecem ser capazes de interagir com as glicoproteínas da zona pelúcida durante o processo de fecundação: PKDREJ (Sutton, Jungnickel, Florman, 2008), SPAM1 ou PH-20 (Primakoff, Lathrop, Woolman, Cowan, Myles, 1988) e zonadesina (Gasper, Swanson, 2006; Hardy, Garbers, 1995; Lea, Sivashanmugam, O’Rand, 2001; Tardif, Wilson, Wagner, Hunt, Gertsenstein, Nagy, et al., 2010; Zhou, Ni, Wu, Chen, Xu, Zhang et al., 2019).

A glicoproteína ZP1 desempenha função importante na manutenção da integridade estrutural da zona pelúcida (Meczekalski, 2009; Springate, Frasier, 2017). A ZP2 parece desempenhar papel importante durante a reação de zona, prevenindo a poliespermia (Avella, Baibakov, Dean, 2014; Springate, Frasier, 2017). Em relação à ZP3, acredita-se que desempenhe função na ligação espécie-específica entre o espermatozoide e ovócito (Springate, Frasier, 2017; Wassarman, Jovine, Litscher, 2001). O papel desempenhado pela ZP4 em humanos não é conhecido, mas presume-se que também seja importante na integridade estrutural da zona pelúcida (Meczekalski, 2009; Springate, Frasier, 2017).

12.1. ZP1

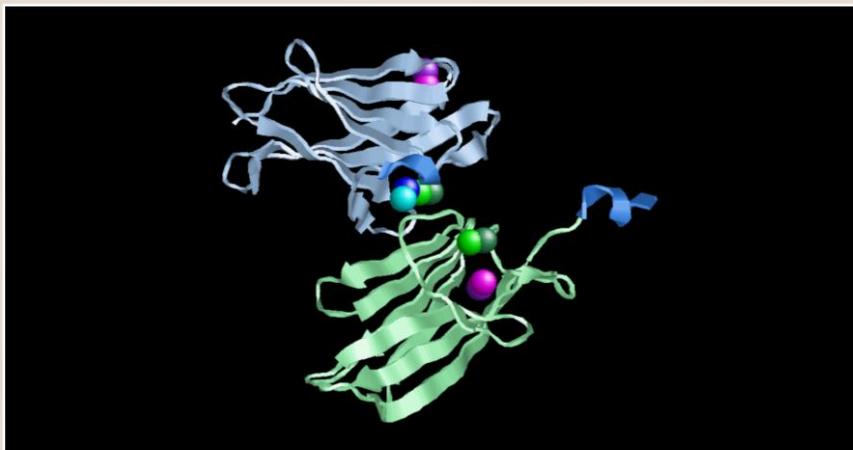
A ZP1 é formada por um dímero composto por duas cadeias monoméricas idênticas. Unindo estas duas cadeias, existe uma ponte dissulfeto intermolecular formada entre os átomos de enxofre dos resíduos de cisteína 66 de cada cadeia. No interior de cada uma das cadeias, existem ainda duas pontes dissulfeto intramoleculares formadas pela união dos resíduos de cisteína 32 e 124, e dos resíduos 69 e 90 (Nishimura, Dioguardi, Nishio, Villa, Han, Matsuda et al., 2019).

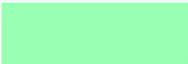
Sua função parece estar relacionada principalmente à manutenção da integridade estrutural da zona pelúcida (Meczekalski, 2009; Springate, Frasier, 2017). Embora existam interações entre a ZP1 e os espermatozoides, estudos sugerem que esta glicoproteína não seja essencial para ligação com o gameta masculino e para fecundação (Rankin, Talbot, Lee, Dean, 1999).

Na figura 11, observa-se a estrutura da ZP1 de galinha (*Gallus gallus*), desenvolvida a partir do arquivo 6GF6.pdb. A molécula está representada no modo *Cartoons*. A cadeia A está representada em azul matiz (*bluetint*) e a cadeia B em verde matiz (*greentint*). Duas alfa-hélices (uma da cadeia A e outra da cadeia B) são mostradas em azul celeste (*skyblue*). Note que a alfa-hélice da cadeia A encontra-se perto da área de interação entre as cadeias e a da cadeia B está posicionada em uma região mais periférica. Unindo as cadeias, uma ponte dissulfeto intermolecular formado pelo átomo de enxofre da cisteína 66 da cadeia A em azul (*blue*) e o átomo de enxofre da cisteína 66 da cadeia B em ciano (*cyan*). Outras pontes dissulfeto intramoleculares são observadas entre os átomos de enxofre das cisteínas 32 das cadeias A e B em púrpura (*purple*) unidos aos átomos de enxofre das cisteínas 124 das cadeias A e B em magenta (*magenta*); e os átomos de enxofre das cisteínas 69 das cadeias A e B em verde (*green*) unidos aos átomos de enxofre das cisteínas 90 das cadeias A e B em verde azulado (*greenblue*).

A programação desenvolvida para visualização da figura 11 no software RasMol está apresentada no quadro 10.

Figura 11 – Estrutura da ZP1



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Cadeia A	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Cadeia B	Verde matiz (<i>greentint</i>)	
Alfa-hélices	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 66 da cadeia A	Azul (<i>blue</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 66 da cadeia B	Ciano (<i>cyan</i>)	
Átomos de enxofre das cisteínas 32 das cadeias A e B	Púrpura (<i>purple</i>)	
Átomos de enxofre das cisteínas 124 das cadeias A e B	Magenta (<i>magenta</i>)	
Átomos de enxofre das cisteínas 69 das cadeias A e B	Verde (<i>green</i>)	
Átomos de enxofre das cisteínas 90 das cadeias A e B	Verde azulado (<i>greenblue</i>)	

Quadro 10 - Script desenvolvido para a estrutura da ZP1

```
load 6gf6.pdb
wireframe off
cartoons
select *a
colour bluetint
select *b
colour greentint
select helix
colour skyblue
select cys.sg
spacefill
select cys66a.sg
colour blue
select cys66b.sg
colour cyan
select cys32.sg
colour purple
select cys124.sg
colour magenta
select cys69.sg
colour green
select cys90.sg
colour greenblue
rotate z 80
zoom 140
```

12.2. ZP2

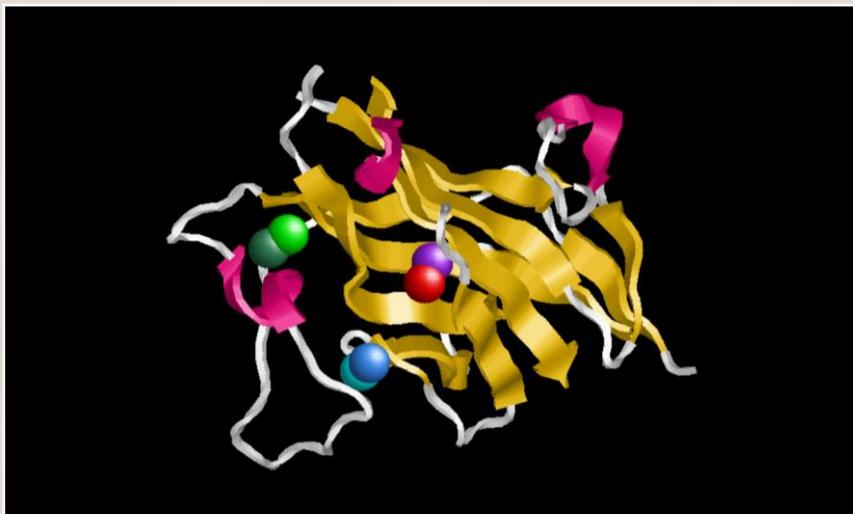
A ZP2 é formada por domínios denominados ZP-N1, ZP-N2, ZP-N3, ZP-N e ZP-C. A ZP-C, o domínio que interage com proteínas do espermatozoide, é formada pelos resíduos 463-664. O domínio ZP-C da ZP2 é formado por 3 alfa-hélices e 11 fitas beta. Sua estrutura é estabilizada com a participação de três pontes dissulfeto intramoleculares, formadas pela interação entre os átomos de enxofre das cisteínas 538, 559, 608, 613, 623 e 627 (Bokhove, Nishimura, Brunati, Han, Sanctis, Rampoldi et al., 2016).

Pesquisadores sugerem que a ZP2 desempenhe um papel importante no reconhecimento dos gametas em mamíferos (Avella, Baibakov, Dean, 2014; Dai, Hu, Gong, Tan, Cai, Zhang et al., 2019; Gahlay, Gauthier, Baibakov, Epifano, Dean, 2010) e também parece desempenhar papel importante na prevenção da poliespermia, por meio da reação de zona (Liang, Chamow, Dean, 1990; Springate, Frasier, 2017).

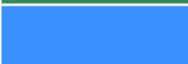
Na figura 12, observa-se a estrutura do domínio ZP-C da ZP2 de camundongo (*Mus musculus*), desenvolvida a partir do arquivo 5BUP.pdb. A molécula está representada no modo Cartoons e colorida no modo Structure. As alfa-hélices estão representadas como espirais em magenta (*structure*) e as folhas beta estão em amarelo (*structure*). Três pontes dissulfeto intramoleculares participam da estabilização da moléculas, sendo formadas pela interação entre os átomos de enxofre das cisteínas 538, 559, 608, 613, 623 e 627, representadas respectivamente em vermelho (*red*), ciano (*cyan*), púrpura (*purple*), verde (*green*), verde azulado (*greenblue*) e azul celeste (*skyblue*).

A programação desenvolvida para visualização da figura 12 no software RasMol está apresentada no quadro 11.

Figura 12 – Estrutura do domínio ZP-C da ZP2



Legenda de cores

Estrutura	Cor	Amostra de cor
Alfa-hélices	Magenta (<i>structure</i>)	
Fitas beta	Amarelo (<i>structure</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 538	Vermelho (<i>red</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 559	Ciano (<i>cyan</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 608	Púrpura (<i>purple</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 613	Verde (<i>green</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 623	Verde azulado (<i>greenblue</i>)	
Átomo de enxofre da cisteína 627	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	

Quadro 11 - Script desenvolvido para o domínio ZP-C da ZP2

```
load 5bup.pdb
wireframe off
cartoons
colour structure
select cys.sg
spacefill
select cys538.sg
colour red
select cys559.sg
colour cyan
select cys608.sg
colour purple
select cys613.sg
colour green
select cys623.sg
colour greenblue
select cys627.sg
colour skyblue
rotate y 60
rotate x 20
translate y 1
zoom 120
```

12.3. ZP3

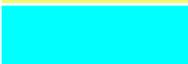
A ZP3 é um homodímero, sendo que cada monômero é formado pelos domínios: ZP-N e ZP-C (que juntos formam a cadeia A do primeiro monômero e a cadeia B do segundo monômero) e um fragmento de bloqueio de polimerização externa hidrofóbica (EHP) (que forma a cadeia C e D do primeiro e segundo monômero, respectivamente). O domínio ZP-N é formado por uma alfa-hélice e 9 fitas beta e o domínio ZP-C por duas alfa-hélices e 16 fitas beta. Existem ainda pontes dissulfeto intramoleculares que estabilizam as cadeias A e B, formadas pela interação entre átomos de enxofre dos resíduos de cisteínas: 58 e 152, 90 e 11, 229 e 295, 251 e 335, 313 e 332, 334 e 340 (Han, Monné, Okumura, Schwend, Cherry, Flot et al., 2010).

Pesquisadores sugerem que a ZP3 desempenhe função na ligação espécie-específica entre o espermatozoide e ovócito (Springate, Frasier, 2017; Wassarman, Jovine, Litscher, 2001). Isso se deve ao fato da treonina 168, presente no domínio ZP-C da cadeia B ser capaz de interagir com a proteína receptora ZP3R, localizada no acrossomo do espermatozoide (Buffone, Zhuang, Ord, Hui, Moss, Gerton, 2008; Muro, Buffone, Okabe, Gerton, 2012).

Na figura 13, observa-se a estrutura da ZP3 da galinha (*Gallus gallus*), desenvolvida a partir do arquivo 3NK3.pdb. A ZP3 está representada no modo *Cartoons*, sendo que domínio ZP-N da cadeia A está representada em azul matiz (*bluetint*), o domínio ZP-C da cadeia A em azul celeste (*skyblue*) e o fragmento de bloqueio de polimerização externa hidrofóbica (EHP ou cadeia C) em azul (*blue*). O domínio ZP-N da cadeia B é representado em rosa matiz (*pinktint*), o domínio ZP-C da cadeia B em rosa (*pink*) e o fragmento de bloqueio de polimerização externa hidrofóbica (EHP ou cadeia d) em cinza (*grey*). As alfa-hélices estão representadas como espirais em amarelo matiz (*yellowtint*) e as fitas beta como setas em cada uma das cadeias. O resíduo de treonina 168 é apresentado em ciano (*cyan*) e os átomos de enxofre que participam de pontes dissulfeto em vermelho (*red*). A programação desenvolvida para visualização da figura 13 no software RasMol está apresentada no quadro 12.

Figura 13 – Estrutura da ZP3



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Domínio ZP-N da cadeia A	Azul matiz (<i>bluetint</i>)	
Domínio ZP-C da cadeia A	Azul celeste (<i>skyblue</i>)	
Cadeia C	Azul (<i>blue</i>)	
Domínio ZP-N da cadeia B	Rosa matiz (<i>pinktint</i>)	
Domínio ZP-C da cadeia B	Rosa (<i>pink</i>)	
Cadeia D	Cinza (<i>grey</i>)	
Alfa-hélices	Amarelo matiz (<i>yellowtint</i>)	
Treonina 168	Ciano (<i>cyan</i>)	
Átomos de enxofre que participam de pontes dissulfeto	Vermelho (<i>red</i>)	

Quadro 12 - Script desenvolvido para a ZP3

```
load 3nk3.pdb
wireframe off
cartoons
select 1-157a
colour bluetint
select 167-380a
colour skyblue
select *c
colour blue
select 1-157b
colour pinktint
select 167-380b
colour pink
select *d
colour grey
select helix
colour yellowtint
select thr168
spacefill
colour cyan
select cys.sg
spacefill
colour red
rotate x -100
rotate z 160
zoom 110
```

13. CRISP1 e 2

A CRISP1 e CRISP2 são membros da família das proteínas secretadas ricas em cistina (CRISP) (Busso, Cohen, Maldera, Dematteis, Cuasnicu, 2007).

A CRISP1 corresponde a uma proteína presente no epidídimo que se associa à região dorsal do acrossomo durante a maturação do espermatozoide no interior do ducto epididimário (Kohane, Cameo, Piñeiro, Garberi, Blaquier, 1980). Esta proteína atua em dois momentos no processo de fertilização. Algumas CRISP1 estão fracamente ligadas ao espermatozoide e participam do processo de ligação do gameta com a zona pelúcida do ovócito. Uma segunda população de CRISP1 podem interagir em sítios de ligação do ovócito comuns à CRISP2 (Cohen, Busso, Da Ros, Ellerman, Maldera, Goldweic et al., 2008).

Um fato interessante a ser mencionado é que esta proteína também está presente na região do *cumulus oophorus* do ovócito, sendo responsável por modular os canais de cálcio CatSper e TRPM8 de espermatozoides, os quais também participam do processo de fertilização (Ernesto, Weigel Muñoz, Battistone, Vasen, Martínez-López, Orta et al., 2015).

A CRISP2 é uma proteína localizada no interior do acrossomo e que permanece associada ao espermatozoide após a capacitação do gameta e reação acrossômica. Devido ao fato da CRISP2 se ligar aos mesmos sítios de ligação da CRISP1 presentes no ovócito, acredita-se que ambas proteínas estejam envolvidas no processo de fertilização (Busso, Goldweic, Hayashi, Kasahara, Cuasnicú, 2007).

Créditos das imagens

1. Crédito da figura da capa, contracapa e páginas capitulares

Wedding Rings, Gold, Wedding, Love, no people, love [Internet]. 2017 Jan 15 [acesso 2020 abr 05]. Disponível em: <https://www.peakpx.com/624685/wedding-rings-gold-wedding-love-no-people-love>. License to use Creative Commons Zero - CC0. Figura registrada como domínio público.

Texturas das páginas de texto

Fonte: Lewis LW. Characterization of Gelbstoffe in Monterey Bay by nylon adsorption, UV, and paper chromatography. File:Characterization of Gelbstoffe in Monterey Bay by nylon adsorption, UV, and paper chromatography. (IA characterization01lewi).pdf [Internet]. 1972 Mar 01 [acesso 2020 jul 19]. p. 2. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Characterization_of_Gelbstoffe_in_Monterey_Bay_by_nylon_adsorption,_UV,_and_paper_chromatography_\(IA_characterization01lewi\).pdf](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Characterization_of_Gelbstoffe_in_Monterey_Bay_by_nylon_adsorption,_UV,_and_paper_chromatography_(IA_characterization01lewi).pdf). Arquivo registrado como domínio público.

Página 4

Fonte: National Archief, the Dutch National Archives. Fotocollectie Anefo. File:Opdracht Behrend. Bruid en bruidegom, Bestanddeelnr 912-5886.jpg [Internet]. 1961 Jun 12 [acesso 2020 jul 19]. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Opdracht_Behrend._Bruid_en_bruidegom,_Bestanddeelnr_912-5886.jpg. Figura registrada como domínio público.

Página 6

Fonte: Old picture of the engagement of Prince Albert (later King Albert I of Belgium) with Duchess Elisabeth Gabrielle Valérie Marie in Bavaria (later Elisabeth, Queen of Belgium). They were married in 1900. File:Verlovingsfoto -Hertog van Brabant.jpg [Internet]. 2011 Sep 25 [acesso 2020 jul 19]. Disponível em:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verlovingsfoto_-_Hertog_van_Brabant.jpg. Figura registrada como domínio público.

Página 8

Fonte: Mayal JJE. The wedding of Prince Albert Edward (later King Edward VII) and Alexandra of Denmark, London, 1863. File:King Edward VII and Queen Alexandra - Wedding -1863.jpg [Internet]. 1863 Mar 10 [acesso 2020 jul 19]. Disponível em:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:King_Edward_VII_and_Queen_Alexandra_-_Wedding_-1863.jpg. Figura registrada como domínio público.

Página 10

Fonte: National Library of Australia. Portrait of unidentified bride in dark dress and groom, Adelaide, between 1901 and 1903. File:(Portrait of unidentified bride in dark dress and groom, Adelaide, between 1901 and 1903) (8446002905).jpg [Internet]. 1901-1903 [acesso 2020 jul 19]. Disponível em:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:\(Portrait_of_unidentified_bride_in_dark_dress_and_groom,_Adelaide,_between_1901_and_1903\)_\(8446002905\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:(Portrait_of_unidentified_bride_in_dark_dress_and_groom,_Adelaide,_between_1901_and_1903)_(8446002905).jpg). Figura registrada como domínio público.

Referências

1. Izumo e Juno

Bianchi E, Wright GJ. Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. *Cell Cycle* [Internet]. 2014 [acesso 2020 mar 01];13(13):2019-20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111690/>.

Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* [Internet]. 2014 Apr 24 [acesso 2020 mar 01];508(7497):483-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature13203#citeas>.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* [Internet]. 2005 Mar 10 [acesso em 2019 dez 12];434(7030):234-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature03362>.

1.1. Estrutura da Izumo 1

Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagiwara Y. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* [Internet]. 2013 Aug [2020 jan 16];140(15):3221-9. Disponível em: <https://dev.biologists.org/content/140/15/3221.long>.

Nishimura K, Han L, Bianchi E, Wright GJ, de Sanctis D, Jovine L. The structure of sperm Izumo1 reveals unexpected similarities with Plasmodium invasion proteins. *Curr Biol* [Internet]. 2016 Jul 25 [acesso 2020 jan 16];26(14):R661-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963209/>.

Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci* [Internet]. 2012 Nov 1 [acesso 2020 jan 16];125(Pt 21):4985-90. Disponível em: <https://jcs.biologists.org/content/125/21/4985.long>.

1.2. Estrutura da Juno

Han L, Nishimura K, Al Hosseini HS, Bianchi E, Wright GJ, Jovine L. Divergent evolution of vitamin B9 binding underlies Juno-mediated adhesion of mammalian gametes. *Current Biology* [Internet]. 2016 Feb 08 [2020 fev 17];26:R83–101. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4751342/>.

Kato K, Satouh Y, Nishimasu H, Kurabayashi A, Morita J, Fujihara Y, Oji A, Ishitani R, Ikawa M, Nureki O. Structural and functional insights into IZUMO1 recognition by JUNO in mammalian fertilization. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Jul 15 [2020 fev 16];7:12198. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4947182/>.

1.3. Interações entre Izumo 1 e Juno

Aydin H, Sultana A, Sheng L, Thavalingam A, Lee JE. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature* [Internet]. 2016 Jun 23 [2020 fev 20];534(7608):562–5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5319863/pdf/nihms6519.pdf>.

2. Acrosina

Crosby JA, Barros C. Effect of recombinant boar β -acrosin on sperm binding to intact zona pellucida during in vitro fertilization. *Biol Reprod* [Internet]. 1999 Dec 01 [acesso 2020 mar 18]; 61(6):1535-40. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/61/6/1535/2734699>.

Gaboriau D, Howes EA, Clark J, Jone R. Binding of sperm proacrosin/ β -acrosin to zona pellucida glycoproteins is sulfate and stereodependent. Synthesis of a novel fertilization inhibitor. *Developmental Biology* [Internet]. 2007 Jun 15 [acesso 2020 mar 29];306(2),646-57. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160607007385?via%3Dihub>.

Tranter R, Read JA, Jones R, Brady RL. Effector sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm β -acrosin. *Structure* [Internet]. 2000 Nov 15 [acesso 2020 mar 18];8(11),1179-88. Disponível em: [https://www.cell.com/structure/fulltext/S0969-2126\(00\)005232?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0969212600005232%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/structure/fulltext/S0969-2126(00)005232?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0969212600005232%3Fshowall%3Dtrue).

3. SLLP1 e SAS1B

Herrero MB, Mandal A, Digilio LC, Coonrod SA, Maier B, Herr JC. Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization. *Dev Biol* [Internet]. 2005 Aug 1 [acesso em 2020 abr 09];284(1):126-42. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160605003003?via%3Dihub>.

Sachdev M, Mandal A, Mulders S, Digilio LC, Panneerdoss S, Suryavathi V et al. Oocyte specific oolemmal SAS1B involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilization. *Dev Biol* [Internet]. 2012 Mar 1 [acesso em 2020 abr 09];363(1):40-51. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3307385/>.

Zheng H, Mandal A, Shumilin IA, Chordia MD, Panneerdoss S, Herr JC, et al. Sperm Lysozyme-Like Protein 1 (SLLP1), an intra-acrosomal oolemmal-binding sperm protein, reveals filamentous organization in protein crystal form. *Andrology* [Internet]. 2015 Jul [acesso 2020 mar 23];3(4):756-71. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5040164/>.

4. CD9, $\alpha 6\beta 1$, ADAM 2 e PSG17

Chen H, Sampson NS. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha 6 beta 1 integrin is the receptor for sperm fertilin beta. *Chem Biol* [Internet]. 1999 Jan [acesso 2020 mar 19];6(1):1-10. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521\(99\)80015-5.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074552199800155%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521(99)80015-5.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074552199800155%3Fshowall%3Dtrue).

Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A et al. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Oct 12 [acesso em 2020 mar 19];96(21):11830-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18372/>.

Ellerman DA, Ha C, Primakoff P, Myles DG, Dveksler GS. Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2003 Dec [2020 mar 19];14(12):5098-103. Disponível em: <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.e03-04-0244>.

Evans JP. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays* [Internet]. 2001 Jul [acesso 2020 mar 19];23(7):628-39. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bies.1088>.

Springate L, Frasier TR. Gamete compatibility genes in mammals: candidates, applications and a potential path forward. *R Soc Open Sci* [Internet]. 2017 Aug 30 [acesso 2020 fev 28];4(8):170577. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170577?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed.

Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2003 Feb [acesso em 2020 mar 19];28(2):106-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12575999/>.

Zhu GZ, Miller BJ, Boucheix C, Rubinstein E, Liu CC, Hynes RO et al. Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development* [Internet]. 2002 Apr [acesso em 2020 mar 19];129(8):1995-2002. Disponível em: <https://dev.biologists.org/content/129/8/1995.long>.

5. CD46

Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T et al. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2003 [2020 jul 18];23(7):2614-22. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150730/>.

- Johnson PM, Clift LE, Andrlíkova P, Jursova M, Flanagan BF, Cummerson JA et al. Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (*Apodemus*). *Reproduction* [Internet]. 2007 [2020 jul 19];134(6):739-47. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/134/6/1340739.xml>.
- Kitamura M, Matsumiya K, Yamanaka M, Takahara S, Hara T, Matsumoto M et al. Possible association of infertility with sperm-specific abnormality of CD46. *J Reprod Immunol* [Internet]. 1997 Apr [acesso 2020 jun 28];33(1):83-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165037897010176?via%3Dihub>.
- Klinovska K, Sebkova N, Dvorakova-Hortova K. Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014 Jun 13 [acesso 2020 abr 21];15(6):10652-68. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4100174/>.
- Liszewski MK, Kemper C, Price JD, Atkinson JP. Emerging roles and new functions of CD46. *Springer Semin Immunopathol* [Internet]. 2005 [acesso 2020 jul 18];27(3):345-58. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-005-0002-3>.
- Lozahic S, Christiansen D, Manié S, et al. CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol P* [Internet]. 2000 [acesso 2020 jul 19];30(3):900-7. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-4141%28200003%2930%3A3%3C900%3A%3AAID-IMMU900%3E3.0.CO%3B2-X>.

Taylor CT, Biljan MM, Kingsland CR, Johnson PM. Inhibition of human spermatozoon-oocyte interaction in vitro by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). *Hum Reprod* [Internet]. 1994 [acesso 2020 jul 18];9(5):907-11. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/9/5/907/635510?redirectedFrom=fulltext>.

6. CD81

Klinovska K, Sebkova N, Dvorakova-Hortova K. Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014 Jun 13 [acesso 2020 abr 21];15(6):10652-68. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4100174/>.

Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1998 [acesso 2020 mar 25];16:89-109. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.16.1.89?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed.

Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, Blacklow SC et al. Crystal structure of a full-length human tetraspanin reveals a cholesterol-binding pocket. *Cell* [Internet]. 2016 Nov 3 [acesso em 2020 abr 21];167(4):1041-1051.e11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5127602/>.

7. Espermesinas

Bork P, Beckmann G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* [Internet]. 1993 May 20 [2020 mai 15];231(2):539-45. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283683713057?via%3Dihub>.

CUB domain [Internet]. 2020 Apr 18 [acesso 2020 mai 10]. Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/CUB_domain.

Dostàlovà Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1994 May 25 [acesso 2020 mai 08];1200(1):48-54. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304416594900264?via%3Dihub>.

Haase B, Schlötterer C, Hundrieser ME, Kuiper H, Distl O, Töpfer-Petersen E et al. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* [Internet]. 2005 Jun 06 [acesso 2020 mai 08];352:20-9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111905002003?via%3Dihub>.

Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostàlovà Z, Sanz L et al. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* [Internet]. 1998 [acesso 2020 mai 08];30(4-5):217-24. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0272.1998.tb01163.x?sid=nlm%3Apubmed>.

7.1. Espermadésinas PSP-I e PSP-II

Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Raida M, Sanz L, Töpfer-Petersen E.

Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS Lett* [Internet]. 1995 May 29 [acesso 2020 mai 16];365(2-3):179-82. Disponível em:

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0014-5793%2895%2900452-F?sid=nlm%3Apubmed>.

Kwok SC, Yang D, Dai G, Soares MJ, Chen S, McMurtry JP. Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I and PSP-II: new members of the spermadhesin family. *DNA Cell Biol* [Internet]. 1993 Sep [acesso 2020 mai 16];12(7):605-10. Disponível em:

<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/dna.1993.12.605>.

Romero A, Romão MJ, Varela PF, Kolln I, Dias JM, Carvalho AL et al. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 1997 Oct 01 [acesso 2020 abr 28];4:783-8. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/nsb1097-783>.

Yang WC, Kwok SCM, Leshin S, Bollo E, Li WI. Purified Porcine Seminal plasma protein enhances in vitro immune activities of porcine peripheral lymphocytes. *Biol Reprod* [Internet]. 1998 Jul 01 [acesso 2020 mai 11];59(1):202-7. Disponível em:

<https://academic.oup.com/biolreprod/article/59/1/202/2740990>.

8. Sp18

Gou KM, Shang LJ, An XR, Lin AX, Ren LM, Chen YF. Short communication: Extraction of sp18 family membrane proteins on posterior head of bull sperm and the effect of anti-sp18 IgG on sperm motility and murine in vitro fertilization. *Animal Biotechnology* [Internet]. 1998 [acesso 2020 mai 26];9(2):149-53. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10495399809525901>

Kresge N, Vacquier VD, Stout CD. The crystal structure of a fusogenic sperm protein reveals extreme surface properties. *Biochemistry* [Internet]. 2001 Apr 10 [acesso 2020 mai 20];40(18):5407-13. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi002779v>.

Vacquier VD, Carner KR, Stout CD. Species-specific sequences of abalone lysin, the sperm protein that creates a hole in the egg envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 1990 Aug [acesso 2020 mai 27];87(15):5792-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC54414/>.

9. PKDERJ

Springate L, Frasier TR. Gamete compatibility genes in mammals: candidates, applications and a potential path forward. *R Soc Open Sci* [Internet]. 2017 Aug 30 [acesso 2020 fev 28];4(8):170577. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170577?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed.

Sutton KA, Jungnickel MK, Florman HM. A polycystin-1 controls postcopulatory reproductive selection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Jun 24 [acesso 2020 mar 11];105(25):8661-6. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/105/25/8661>.

Vicens A, Montoto LG, Couso-Ferrer F, Sutton KA, Roldan ERS. Sexual selection and the adaptive evolution of PKDREJ protein in primates and rodents. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2015 Feb [acesso 2020 mar 06];21(2),146-56. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4311147/>.

10. SPAM1

Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol* [Internet]. 2001 Dec [acesso 2020 mar 18];20(8):515-25. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X01001718?via%3Dihub>.

Evans EA, Zhang H, Martin-DeLeon PA. SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2003 Aug 06 [acesso 2020 mar 14];1:54. Disponível em: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-1-54#citeas>.

Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *J Cell Biol* [Internet]. 1994 Jun [acesso 2020 mar 18];125(5):1157-63. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/55/1/80/2760610>.

Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Primakoff P, Li MW, Overstreet JW. The PH-20 protein in human spermatozoa. *J Androl* [Internet]. 1997 Mar-Apr [acesso 2020 mar 18];18(2):151-8. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.1997.tb01895.x?sid=nlm%3Apubmed>.

Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse Spam1 (PH-20) Is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biology of Reproduction* [Internet]. 2003 Aug 01 [acesso 2020 mar 16];69(2), 446–54. Disponível: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/69/2/446/2712839>.

11. Zonadesina

Gasper J, Swanson WJ. Molecular population genetics of the gene encoding the human fertilization protein zonadhesin reveals rapid adaptive evolution. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2006 Nov [acesso 2020 mar 18];79(5):820-30. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1698559/>.

Hardy DM, Garbers DL. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Nov 3 [acesso 2020 mar 18];270(44):26025-8. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/270/44/26025.long>.

Lea IA, Sivashanmugam P, O'Rand MG. Zonadhesin: characterization, localization, and zona pellucida binding. *Biol Reprod* [Internet]. 2001 Dec [acesso 2020 mar 18];65(6):1691-700. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/65/6/1691/2723305>.

Tardif S, Cormier N. Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: a species-specific acrosomal molecule with multiple functions. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2011 Nov [acesso 2020 mar 18];17(11):661-8. Disponível em: <https://academic.oup.com/molehr/article/17/11/661/1028448>.

Tardif S, Wilson MD, Wagner R, Hunt P, Gertsenstein M, Nagy A. et al. Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion to the egg zona pellucida. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Aug 6 [acesso 2020 mar 18];285(32):24863-70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2915722/>.

12. Glicoproteínas ZP

Avella MA, Baibakov B, Dean J. A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J Cell Biol* [Internet]. 2014 [acesso 2020 jun 06];205(6):801-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068139/>.

Gasper J, Swanson WJ. Molecular population genetics of the gene encoding the human fertilization protein zonadhesin reveals rapid adaptive evolution. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2006 Nov [acesso 2020 mar 18];79(5):820-30. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1698559/>.

Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biol Reprod* [Internet]. 2008 [acesso 2020 jun 03];78(5):796-806. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18046012/>.

Gupta SK. Chapter twelve - the human egg's zona pellucida. *Curr Top Dev Biol* [Internet]. 2018 [acesso 2020 jun 01];130:379-411. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0070215318300012?via%3Dihub>.

- Gupta SK, Bansal P, Ganguly A, Bhandari B, Chakrabarti K. Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2009 [acesso 2020 mai 31];83(1-2):50-5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016503780900446X?via%3Dihub>.
- Hardy DM, Garbers DL. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Nov 3 [acesso 2020 mar 18];270(44):26025-8. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/270/44/26025.long>.
- Izquierdo-Rico MJ, Jiménez-Movilla M, Llop E, Pérez-Oliva AB, Ballesta J, Gutiérrez-Gallego R et al. Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *J Proteome Res* [Internet]. 2009 Jan 21 [acesso 2020 jun 02];8(2):926-41. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/pr800568x>.
- Lea IA, Sivashanmugam P, O'Rand MG. Zonadhesin: characterization, localization, and zona pellucida binding. *Biol Reprod* [Internet]. 2001 Dec [acesso 2020 mar 18];65(6):1691-700. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/65/6/1691/2723305>.
- Meczekalski B. Oocyte-specific genes: role in fertility and infertility. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2009 [acesso 2020 jun 06];32(5):474-81. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03346489>.
- Primakoff P, Lathrop W, Woolman L, Cowan A, Myles D. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature* [Internet]. 1988 [acesso 2020 jun 03];335(6190):543-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/335543a0>.

- Springate L, Frasier TR. Gamete compatibility genes in mammals: candidates, applications and a potential path forward. *R Soc Open Sci* [Internet]. 2017 Aug 30 [acesso 2020 fev 28];4(8):170577. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170577?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed.
- Sutton KA, Jungnickel MK, Florman HM. A polycystin-1 controls postcopulatory reproductive selection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Jun 24 [acesso 2020 mar 11];105(25):8661-6. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/105/25/8661>.
- Tardif S, Cormier N. Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: a species-specific acrosomal molecule with multiple functions. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2011 Nov [acesso 2020 mar 18];17(11):661-8. Disponível em: <https://academic.oup.com/molehr/article/17/11/661/1028448>.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2001 [acesso 2020 jun 03];3(2):E59-E64. Disponível em: https://www.nature.com/articles/ncb0201_e59.
- Zhou Z, Ni C, Wu L, Chen B, Xu Y, Zhang Z et al. Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Hum Genet* [Internet]. 2019 Feb 27 [acesso 2020 jun 01];138(4):327-37. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00439-019-01990-1>.

12.1. ZP1

Meczekalski B. Oocyte-specific genes: role in fertility and infertility. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2009 [acesso 2020 jun 06];32(5):474-81. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03346489>.

Nishimura K, Dioguardi E, Nishio S, Villa A, Han L, Matsuda T et al. Molecular basis of egg coat cross-linking sheds light on ZP1-associated female infertility. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Jul 12 [acesso 2020 jun 04];10:3086. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626044/>.

Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* [Internet]. 1999 [acesso 2020 mai 31];126(17):3847-55. Disponível em: <https://dev.biologists.org/content/126/17/3847.long>.

Springate L, Frasier TR. Gamete compatibility genes in mammals: candidates, applications and a potential path forward. *R Soc Open Sci* [Internet]. 2017 Aug 30 [acesso 2020 fev 28];4(8):170577. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170577?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed.

12.2. ZP2

Avella MA, Baibakov B, Dean J. A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J Cell Biol* [Internet]. 2014 Jun 23 [acesso 2020 jun 10];205(6):801-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068139/>.

- Bokhove M, Nishimura K, Brunati M, Han L, Sanctis D, Rampoldi L et al. A structured interdomain linker directs self-polymerization of human uromodulin Proc Natl Acad Sci USA [Internet]. 2016 Feb 09 [acesso 2020 jun 15];113(6):1552-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4760807/>.
- Dai C, Hu L, Gong F, Tan Y, Cai S, Zhang S et al. ZP2 pathogenic variants cause in vitro fertilization failure and female infertility. Genet Med [Internet]. 2019 Feb [acesso 2020 jun 12];21(2):431-40. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41436-018-0064-y>.
- Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. Science [Internet]. 2010 Jul 9 [acesso em 2020 jun 16]; 329(5988):216–9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3272265/>.
- Liang LF, Chamow SM, Dean J. Oocyte-specific expression of mouse ZP-2: developmental regulation of the zona pellucida genes. Mol Cell Biol [Internet]. 1990 Apr [acesso 2020 jun 12];10(4):1507-15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC362254/>.
- Springate L, Frasier TR. Gamete compatibility genes in mammals: candidates, applications and a potential path forward. R Soc Open Sci [Internet]. 2017 Aug 30 [acesso 2020 fev 28];4(8):170577. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170577?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed.

12.3. ZP3

Buffone MG, Zhuang T, Ord TS, Hui L, Moss SB, Gerton GL.

Recombinant mouse sperm zp3-binding protein (ZP3R/sp56) forms a high order oligomer that binds eggs and inhibits mouse fertilization in vitro. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 May 02 [acesso 2020 jun 18];283(18):12438-45. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2431013/>.

Han L, Monné M, Okumura H, Schwend T, Cherry AL, Flot D et al.

Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the x-ray structure of full-length ZP3. *Cell* [Internet]. 2010 Oct 29 [acesso 2020 jun 20];143(3):404-15. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(10\)01127-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741001127X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(10)01127-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741001127X%3Fshowall%3Dtrue).

Muro Y, Buffone MG, Okabe M, Gerton GL. Function of the acrosomal matrix: zona pellucida 3 receptor (ZP3R/sp56) is not essential for mouse fertilization. *Biol Reprod* [Internet]. 2012 Jan 01 [acesso 2020 jun 17];86(1):1-6. Disponível em:

<https://academic.oup.com/biolreprod/article/86/1/23,%201-6/2530636>.

Springate L, Frasier TR. Gamete compatibility genes in mammals: candidates, applications and a potential path forward. *R Soc Open Sci* [Internet]. 2017 Aug 30 [acesso 2020 fev 28];4(8):170577.

Disponível em:

https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.170577?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed.

Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2001 [acesso 2020 jun 03];3(2):E59-E64. Disponível em:

https://www.nature.com/articles/ncb0201_e59.

13. CRISP1 e 2

Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A, Cuasnicu PS. A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol Reprod* [Internet]. 2007 Nov [acesso 2020 mar 04];77(5):848-54. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/77/5/848/2629818>.

Busso D, Goldweic NM, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicú PS. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. *Biol Reprod* [Internet]. 2007 Apr [acesso 2020 mar 04];76(4):701-8. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/76/4/701/2629666>.

Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, et al. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2008 [acesso 2020 mar 04];52(5-6):737-42. Disponível em: <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=10.1387/ijdb.072538dc>.

Ernesto JI, Weigel Muñoz M, Battistone MA, Vasen G, Martínez-López P, Orta G et al. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J Cell Biol* [Internet]. 2015 Sep 28 [acesso 2020 mar 04];210(7):1213-24. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586743/>.

Kohane AC, Cameo MS, Piñeiro L, Garberi JC, Blaquier JA. Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol Reprod*. 1980 Aug [acesso 2020 mar 04];23(1):181-7. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/23/1/181/2766856>.

Este livro foi concebido como um material multidisciplinar de apoio pedagógico no processo de ensino-aprendizagem das Disciplinas de Bioquímica Estrutural, Embriologia e Reprodução Humana.

São apresentadas as funções das principais proteínas presentes em espermatozoides e ovócitos envolvidas no processo de fecundação. A estrutura bioquímica de algumas delas são apresentadas utilizando um programa de simulação computacional de biomoléculas.

