



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la integridad de la membrana del espermatozoide sometido a procesos de criopreservación

Fabián Leonardo Rueda Alfonso

**Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Salud Animal
Bogotá, D.C.
2011**

Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la integridad de la membrana del espermatozoide sometido a procesos de criopreservación

Fabián Leonardo Rueda Alfonso

Tesis de Maestría para optar al título de Magister en salud animal

Dirigido por:

Aureliano Hernández Vásquez. DMV. MSc. PhD.

Codirector

Jaime Cardozo Cerquera

MVZ, MSc. PhD

Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Maestría en Salud Animal

Bogotá, D.C.

2011

Resumen

Algunas proteínas del plasma seminal se relacionan con la viabilidad espermática y se pueden usar para revertir los efectos de la criopreservación en semen bovino. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de adicionar proteínas del plasma seminal en la viabilidad espermática postdescongelación de semen de toros Sanmartinero y Cebú. Se obtuvo plasma seminal de 10 toros de cada raza y se determinaron los perfiles electroforéticos bidimensionales para establecer la relación entre la cantidad relativa de cada punto de proteína y los porcentajes de viabilidad espermática. Identificados los puntos que presentaron correlación con la viabilidad, se separó el plasma seminal en fracciones mediante cromatografía de exclusión y aquellas que contenían las proteínas de interés se adicionaron a 1×10^6 descongelados e incubados a 37°C durante una hora. En plasma de Sanmartinero se detectó un punto de peso molecular 16.20 kDa y punto Isoeléctrico 5.5, que evidenció correlación con la viabilidad espermática ($r=0.64$ $p<0.001$). Se usó la fracción cromatográfica 20-25, que contenía este punto. La electroforesis bidimensional de la fracción 20-25, evidenció siete puntos (pesos moleculares de 14-16 kDa y puntos Isoeléctricos de 5.0 - 5.5). La incubación con esta fracción, demostró que el porcentaje de espermatozoides viables de toros Sanmartinero aumenta 20% ($p>0,05$) con dosis de 1 y 1.5 $\text{mg}/10^6$ espermatozoides, congelados en medio citrato-fructosa y 25% ($p>0,05$) con dosis de 0.5 $\text{mg}/10^6$ espermatozoides congelados en medio Bioxcell. Los resultados permiten sugerir el uso de proteínas del plasma seminal para disminuir el daño en los espermatozoides por la criopreservación.

Palabras clave: Plasma seminal, Viabilidad espermática, Calidad seminal, Electroforesis bidimensional, Criopreservación

Abstract

Some seminal plasma proteins are related to sperm viability and may be used to reverse the effects of cryopreservation on bull semen. The objective of this research was to determine the effect of add seminal plasma proteins in post-thaw sperm viability of Sanmartinero and Cebu bulls. Seminal plasma was obtained from 10 bulls of each breed and two-dimensional electrophoresis profiles. Seminal

plasma was separated into fractions by size exclusion chromatography, and those containing the proteins of interest were added to 1×10^6 thawed and incubated at 37°C for one hour. In Sanmartinero plasma was detected one point (16.20 kDa molecular weight and isoelectric point 5.5), which correlated with the sperm viability ($r = 0.64$ $p < 0.001$). 20-25 chromatographic fraction was used, which contained this point. Dimensional electrophoresis of fraction 20-25, show seven points (14-16 kDa molecular weight and isoelectric points of 5.0 - 5.5). The incubation with this fraction showed that the percentage of viable sperm from bulls Sanmartinero increases 20% ($p > 0.05$) at doses between 1 and $1.5 \text{ mg}/10^6$ sperm frozen in citrate-fructose medium and 25% ($p > 0, 05$) with $0.5 \text{ mg}/10^6$ Bioxcell medium. Results suggest the use of seminal plasma proteins to reduce the sperm cryopreservation damage.

Key words: Seminal plasma, Sperm viability, Seminal quality, Two dimensional electrophoresis, Cryopreservation.

Declaratoria de originalidad

Declaro que los resultados presentados en éste trabajo son totalmente originales

A mi Madre por su apoyo incondicional,

*A Javier, William, Héctor y Daniel por su
amistad, su alegría y sus valiosos consejos*

Y muy especialmente:

*A Luisa, la mujer de mi vida. Por su apoyo,
por su amor y por ser la mujer que me
enseñó lo que significa el amor verdadero*

Agradecimientos

Agradezco de forma especial al Doctor Jaime Antonio Cardozo por su apoyo, su confianza y por darme la oportunidad de trabajar con él desde hace tiempo; y al Doctor Aureliano Hernández por apoyarme en todo este proceso.

A Rocío Herrera, Samuel Correa, Eliana Neira, Gustavo Quijano, Manuel Ostos, Miguel Ángel Peña, Henry Velásquez y Guillermo Velásquez, pues sin su ayuda hubiese sido imposible realizar éste trabajo.

Al Doctor Luis Fernando Arbeláez, por su enorme apoyo desde la Universidad de Pamplona, así como a Tatiana Garcés por su colaboración.

A mis compañeros de los laboratorios de Microbiología Molecular y Nutrición Animal y a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA

Contenido

Introducción	1
Capítulo 1. Marco teórico	5
Proteínas de la membrana espermática	5
Proteínas del plasma seminal	7
Relación de las proteínas del plasma seminal con la reversión del daño en la membrana espermática ocasionado por los procesos de criopreservación	10
Proteínas del plasma seminal	11
Criopreservación de semen y daños en la membrana del espermatozoide	14
Electroforesis sds- bidimensional como herramienta para la separación de las proteínas	15
Referencias	16
Objetivos	21
General	21
Específicos	21
Capítulo 2	23
Proteínas de plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la calidad seminal	23
Resumen	23
Abstract	23
Introducción	25
Materiales y métodos	26
Unidades experimentales y toma de muestras	26
Obtención del plasma seminal y cuantificación de proteína	27
Electroforesis SDS 2D	27
Toros de referencia	28
Análisis estadístico	28
Resultados	28
Variables de calidad seminal	28
Concentración de proteínas en plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú	29
Proteínas del plasma seminal de los toros control	30
Relación entre las proteínas del plasma seminal y la calidad seminal.	41
DISCUSIÓN	44
Calidad seminal	44
Concentración de proteínas en plasma seminal	44
Proteínas del plasma seminal de los toros control	45
Perfiles electroforéticos de proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú (grupo experimental)	48
Proteínas de plasma seminal y calidad seminal	51
Conclusiones	54
Recomendaciones	56

Bibliografía	56
Capítulo 3	61
Efecto de la adición de proteínas del plasma seminal en la integridad de la membrana de espermatozoides de toros sanmartinero y cebú sometidos a criopreservación	61
Resumen	61
Abstract	61
Introducción	63
Materiales y métodos	65
Unidades experimentales	65
Criopreservación del semen	65
Colección de plasma seminal y cuantificación de proteínas	66
Cromatografía de exclusión por tamaño	66
Electroforesis unidimensional	67
Electroforesis bidimensional	67
Adición de las proteínas separadas a semen criopreservado	67
Análisis estadístico	69
Resultados	69
Separación de fracciones de proteínas de plasma seminal mediante cromatografía de exclusión	69
Adición de las fracciones 20 a 25 obtenidas por cromatografía de exclusión ..	73
Viabilidad post descongelación y efecto de recuperación de la viabilidad en toros de razas Sanmartinero y Cebú	76
Discusión	78
Separación Cromatográfica de proteínas del plasma seminal	78
Adición de las proteínas de plasma seminal contenidas en las fracciones 20-25, a espermatozoides descongelados	79
Conclusiones	85
Recomendaciones	87
Bibliografía	89

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Calidad seminal (viabilidad, motilidad y concentración espermática en semen de toros de las razas Sanmartinero y Cebú.....	29
Tabla 2. Comparación de pesos moleculares (MW) y puntos isoeléctricos (pI) de los puntos determinados en este trabajo con los MW y pI reportados en otras investigaciones para proteínas BSP.....	32
Tabla 3. Comparación de pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los puntos determinados en este trabajo con los pesos moleculares y puntos isoelectricos reportados en otras investigaciones para proteínas Clusterina	33
Tabla 4. Comparación de MW y pI de los puntos determinados en este trabajo con los MW y pI reportados en otras investigaciones para proteínas Espermadhesinas Z 13	33
Tabla 5. Comparación de MW y pI de los puntos determinados en este trabajo con los MW y pI reportados en otras investigaciones para Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa TIMP-2	34
Tabla 6. Comparación de MW y pI de los puntos determinados en este trabajo con los MW y pI reportados en otras investigaciones para proteínas ácidas del plasma seminal aSFP	34
Tabla 7. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los puntos de proteína exclusivos de la raza Sanmartinero. Se señalan los puntos que aparecen con mayor frecuencia.....	38
Tabla 8. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los puntos de proteína exclusivos de la raza Cebú. Se señalan los puntos que se presentaron con mayor frecuencia.....	39
Tabla 9. Puntos de proteína que presentaron diferencia significativa ($p \leq 0,05$) cuando se compararon las cantidades relativas de cada punto en las razas Sanmartinero (SM) y Cebú.....	40
Tabla 10. Coeficientes de correlación entre puntos de proteína y parámetros de calidad seminal en plasma de toros Sanmartinero.....	42
Tabla 11. Coeficientes de correlación entre puntos de proteína y parámetros de calidad seminal en plasma de toros Cebú.....	43

Tabla 12. Concentraciones de proteína en diferentes fracciones (tubos). Las fracciones 20 a 25 contienen la mayor cantidad de proteína (entre 90 y 113 mg/ml).....71

Tabla 13. Porcentaje de viabilidad espermática en semen fresco y descongelado con medio Bioxcell en incubado con diferentes dosis de la fracción 20-25 post-descongelación. 75

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 . Mapa de proteínas del plasma seminal de toro Sanmartinero, captado directamente del gel. Las flechas indican proteínas que coinciden en ubicación con BSP A1/A2 (PDC 109), BSP A3, BSP 30 kDa y Espermadhesina Z13. Tomado de: Barajas, 2009	8
Figura 2. Mapa de proteínas del plasma seminal de toros Holstein. A la izquierda se indica el marcador de peso molecular. La flecha de abajo señala la dirección del gradiente de pH básico (izquierda) y ácido (derecha). Se identifican grupos de proteínas BSP A1/A2 (PDC 109), BSP A3, BSP 30 kDa , Espermadhesina Z13, clusterina y albúmina entre otras. Tomado de: Moura., 2007.....	9
Figura 3. Mapa electroforético de plasma seminal de toro Cebú. A la izquierda se indica el marcador de peso molecular. La flecha de arriba señala la dirección del gradiente de pH básico (derecha) y ácido (izquierda). Se señala el conjunto de puntos que tiene correlación con toros cuyo semen posee alto potencial fertilizante. Tomado de: Roncoletta., 2006.....	9
Figura 4. Microscopia electrónica de espermatozoides de carnero A) obtenidos por swim up, B) sometidos a choque térmico, C) sometidos a choque térmico e incubados con 0,7 mg de proteínas de plasma seminal, D) sometidos a choque térmico e incubados con 0,7 mg de proteínas de plasma seminal de la sexta fracción de proteínas. Magnificación de 13000X . Tomado de: Barrios y Perez., 2000.....	11
Figura 5. Estructura primaria y organización de los dominios de fibronectina de las PDC 109. a. estructura primaria de las PDC 109. b. organización de los dominios de fibronectina, los dos dominios Fn2 son muy similares pero no idénticos. Tomado de: Musti, S. Current Science vol 87: 2004.....	12
Figura 6. Microscopia electrónica de: A, espermatozoides sometidos a 5°C de forma intempestiva y B, espermatozoides sometidos a 5°C de forma gradual. Tomado de : Walton A., Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, Vol. 147, No. 929. 1957.....	14
Figura 7. Reporte del IDEAM de los promedios de precipitación mensuales. Mayo y Junio presentan los promedios de precipitación (mm) más altos. Tomado de: IDEAM pagina Web, www.ideam.gov.co	26
Figura 8. Tendencias de las concentraciones de proteína (mg/ml) en plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú a través del tiempo.....	29
Figura 9. Mapas bidimensionales de proteínas de plasma seminal de los toros control. A. Mapa electroforético bidimensional de proteínas del plasma seminal de un toro Sanmartinero, A(v) Imagen Virtual generada mediante el programa de análisis de imágenes, B. Mapa electroforético bidimensional de proteínas del plasma seminal de un toro Cebú y B(v) Imagen Virtual generada mediante el programa de análisis de imágenes.....	30
Figura 10. Gel bidimensional con carga excesiva de proteína. Los grupos de proteínas señalados con un círculo, con peso molecular entre 14 y 30 kDa presentan gran dificultad en el análisis por la baja resolución de los puntos.....	31
Figura 11. Semejanzas entre geles bidimensionales virtuales generados a partir de PD Quest de: A. Proteínas de fluido de las glándulas accesorias (Tomado de Moura 2007), B. Proteínas de plasma seminal de toros Cebú y C. Proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero. Los círculos representan el grupo caracterizado como BSP A1, A2 y A3, los rectángulos muestran las denominadas BSP 30 kDa, los triángulos muestran el grupo	

de clusterinas, los rombos señalan grupos de Espermadhesinas Z13 y los hexágonos muestran el inhibidor de metaloproteinasa TIMP-2. Las cruces de la parte inferior derecha representan las aSFP presente solo en A y C.....	32
Figura 12. Mapa electroforético del plasma seminal del toros Sanmartinero (virtual) generado por el programa de análisis de imágenes PD Quest de Bio Rad®. La sección roja corresponde a la parte del gel que contiene las proteínas con pH básico. Las flechas señalan los puntos de proteínas con la mayor concentración relativa.....	35
Figura 13. Mapa electroforético del plasma seminal del toros Sanmartinero (virtual) generado por el programa de análisis de imágenes PD Quest de Bio Rad®. La sección roja corresponde a la parte del gel que contiene las proteínas con pH básico. Las flechas señalan los puntos de proteínas con la mayor concentración relativa.....	36
Figura 14. Diferencias de cantidad relativa en porcentaje en grupos de puntos entre mapas electroforéticos de plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú.....	36
Figura 15. Mapa electroforético de plasma seminal de toros Sanmartinero.. Los puntos señalados se presentaron exclusivamente en toros de ésta raza.....	37
Figura 16. Mapa electroforético de plasma seminal de toros Cebú. Los puntos señalados solamente se presentaron en toros de ésta raza.....	38
Figura 17. Diferencias significativas ($p < 0.05$) en cantidades relativas de proteínas de plasma seminal de Sanmartinero y Cebú. Las flechas verdes indican los puntos de proteína que tienen mayor cantidad en Sanmartinero y las rojas señalan los puntos con mayor cantidad en plasma de Cebú. Los números que aparecen en la imagen son asignados aleatoriamente por el programa de análisis de imágenes PD quest.	40
Figura 18. Mapa electroforético de proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero. Se señalan los puntos que presentaron correlación estadística con la viabilidad espermática.	41
Figura 19. Mapa electroforético de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Se señalan los puntos que presentaron correlación estadística con la viabilidad espermática.....	42
Figura 20. Mapa electroforético virtual de proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero. Se señalan los puntos que presentaron correlación estadística entre sí....	43
Figura 21. Espermatozoides teñidos con Carboxifluoresceína-Ioduro de propidio.(A). Espermatozoides con membrana espermática íntegra (viables). (B) Espermatozoides con membrana espermática dañada (no viables).....	68
Figura 22. Cromatograma del fraccionamiento de proteínas del plasma seminal mediante cromatografía de exclusión por tamaño se señala el pico más abundante que comprende las fracciones 20 a 25.....	70
Figura 23. Concentración de proteínas en las diferentes fracciones obtenidas. Las fracciones 10 a 15 y 20 a 25 presentaron las mayores concentraciones.	70
Figura 24. Electroforesis en 1 dimensión de las proteínas obtenidas en las fracciones colectadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Línea 1: Marcador de peso molecular (MP), línea 2: Plasma seminal completo (PSC), línea 3: concentrado de las fracciones 10 a 14 (F10-14), línea 4: concentrado de las fracciones 15 y 16 (F15-16), líneas 5 a 7: fracciones 17, 18 y 19, línea 8: fracción 20 (F20) y líneas 9 y 10: Concentrado de fracciones 20 a 25 (CF 20-25). Se señalan las 3 últimas líneas con bandas de 13 y 16 kDa.....	72
Figura 25. Electroforesis bidimensional de plasma seminal de Sanmartinero con rango de separación de pH 4 a 7. A. Gel bidimensional de plasma seminal completo. B. Gel bidimensional de la fracción 20, se señalan los pesos moleculares aproximados y los puntos isoeléctricos de los 7 puntos presentes en las bandas de 14 y 16 kDa. Se resalta el punto con pI 5.5, de interés por su correlación con la viabilidad espermática (Ver capítulo anterior).	72

Figura 26. Incremento porcentual de la viabilidad post-descongelación de 1 millón de espermatozoides criopreservados con: A) yema de huevo y B) Biocell® comercial. Los espermatozoides se descongelaron e incubaron con diferentes concentraciones de proteínas contenidas en la fracción 20-25 durante 1 hora a 37 C°.....	74
Figura 27. Porcentaje de recuperación de la viabilidad de la membrana espermática en espermatozoides descongelados e incubados con la fracción F20-25 durante 1 hora a 37 C°. La viabilidad se midió como el porcentaje de células con membrana integra sometidas a tinción de carboxifluoresceína-ioduro de propidio y el porcentaje de recuperación se evaluó mediante la fórmula $[(Vp60-Vc60)/(Vw-Vc60)] \times 100$, donde Vp60 es la viabilidad de la muestra incubada 60 minutos con proteína adicionada; Vc60 es la viabilidad de la muestra incubada 60 minutos sin proteínas; y Vw es la viabilidad de la muestra fresca.	76
Figura 28. Porcentajes de viabilidad espermática en semen de toros de las razas Sanmartinero y Cebú en semen fresco, descongelado e incubado con una dosis de fracción 20-25 de 0.5 mg/10 ⁶ espermatozoides. Se aprecia diferencia significativa (p<0.05) solo en el tratamiento con la fracción 20-25 en espermatozoides de Sanmartinero.	77
Figura 29. Porcentajes de recuperación de la viabilidad espermática en semen de toros de las razas Sanmartinero y Cebú, luego de ser incubados con 0.5 mg de proteína de la fracción 20-25. Se aprecia diferencia significativa (p<0.05) en el porcentaje de recuperación de la viabilidad de espermatozoides de Sanmartinero con respecto a los espermatozoides de toros Cebú.....	77

Lista de anexos

	Pág.
Anexo 1. Formato de recolección de datos establecido por el Centro de Reproducción Animal Integral CRIA, para muestreos de semen bovino.....	93
Anexo 2. Protocolo estándar establecido por la Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria CORPOICA para uso de nanodrop en la medición de proteínas.....	93
Anexo 3. Tiras de Isoelectroenfoco IEF, de 7 cm y rango de pI de 3 a 10	97
Anexo 4. Protocolo estándar establecido por la Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria CORPOICA para elaboración de electroforesis bidimensional.....	99
Anexo 5. Historial de Calidad seminal y congelaciones de los toros empleados como referencia en los mapas electroforéticos bidimensionales	103
Anexo 6. Estructura tridimensional de la proteína aSFP elaborada a través del programa Cn3D 4.1, a partir de la secuencia de aminoácidos reportada por la NCBI proteins. En amarillo la posición de las cisteínas que forman puentes bisulfuro con potencial de oxidoreducción.....	105
Anexo 7. Espermatozoides sometidos a inmunofluorescencia para determinar los patrones de unión de proteínas BSP A1 y A2. (a) Espermatozoide con acrosoma intacto incubado con fluido uterino no luteal y (b) Espermatozoide con acrosoma intacto incubado con fluido ampular. Se aprecia alta fluorescencia en la parte media del espermatozoide lo que indica altos patrones de adhesión de proteínas BSP. Tomado de: Souza., 2008.....	107
Anexo 8. Estructura primaria de las proteínas BSP. Los puntos de unión a los carbohidratos se representan con puntos Tomado de: Manjunath y Therien., 2002.....	109
Anexo 9. Cromatógrafo de baja presión Bio Logic de BioRad con colector de fracciones automático y columna con matriz de sefacril S-100.	111
Anexo 10. Celda de Ultrafiltración con corriente de nitrógeno Amicon de Millipore®	113
Anexo 11. Cromatograma y Electroforesis en 1 dimensión de las proteínas obtenidas en las fracciones colectadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de Sefacril S-50. Tomado de: Calvete., 1996	115
Anexo 12. Electroforesis SDS de 1) Marcador de peso, 2) plasma seminal ovino completo y 3 a 6) fracciones eluidas por cromatografía mediante el uso de columnas de Sephacril S-100. Tomado de Barrios, 2000	117
Anexo 13. Proteínas de plasma seminal bovino relacionadas con la congelabilidad del semen. Las flechas arriba indican la dirección del gradiente de pH de básico (-) a ácido(+) y viceversa. En la mitad se muestra el marcador de peso molecular. Las flechas dentro de la imagen señalan los puntos que presentaron diferencias significativas (p<0.05) en los toros de A) alta congelabilidad y B) baja congelabilidad. Tomado de: Jobim, 2004.....	119

Introducción

La baja eficiencia reproductiva del hato bovino, sigue siendo uno de los problemas que más afecta los índices productivos de los principales sistemas de explotación ganadera. La fertilidad del toro incide de forma muy importante en los índices reproductivos del hato; en este sentido, las investigaciones nacionales e internacionales se han encaminado al desarrollo de procedimientos metodológicos que permitan evaluar con mayor criterio y confiabilidad la fertilidad del macho reproductor. Se ha reportado que los métodos convencionales para evaluar la fertilidad de los toros, tales como la determinación de la concentración espermática, volumen del eyaculado, motilidad y morfología espermática, no siempre predicen en debida forma la fertilidad del animal (Blottner et al., 1992; Whitfield y Parkinson, 1992; Medina y Pérez, 1998). En contraste, los estudios *in vitro* que se han adelantado para evaluar la capacidad fecundante del espermatozoide, como la inducción de la reacción acrosómica, la determinación del porcentaje de oocitos penetrados y el test hiposmótico entre otros, han mostrado gran correlación con las tasas de no retorno al estro a los 90 días y con los porcentajes de concepción al primer servicio (Correa et al., 1994; Henault y Killian, 1995; Correa et al., 1997).

El grupo de investigación de ecofisiología animal de CORPOICA, ajustó e implementó las técnicas *in vitro* de penetración espermática de oocitos bovinos y de inducción de la reacción acrosómica del espermatozoide, con el fin de evaluar la habilidad fecundante de espermatozoides de toros de las razas criollas colombianas (Sanmartinero, Romosinuano, Blanco Orejinegro y Costeño con Cuernos) y las razas foráneas Cebú y Holstein (Martinez y Luque, 1996; Medina y Perez, 1998; Bedoya, 1999 ; Martinez y Rodriguez, 2002). Estas investigaciones evidenciaron que los porcentajes de oocitos penetrados *in vitro* por espermatozoides de toros criollos son superiores ($p > 0,05$) a los presentados por espermatozoides de las razas foráneas; sin embargo no se conocen con exactitud los factores por los cuales se presentan estas diferencias. Lo anterior ha llevado a proponer a macromoléculas como enzimas, proteínas, carbohidratos y lípidos, presentes no solo en el espermatozoide sino también en el plasma seminal, como responsables de la presencia de toros más fértiles que otros. De otra parte, el espermatozoide es una célula especializada que carece de síntesis de proteínas, razón por la cual necesita incorporar proteínas del plasma seminal para llevar a cabo procesos de capacitación, reacción acrosómica, reconocimiento e interacción con la zona pelúcida del oocito e incluso se ha propuesto a algunas de estas proteínas como candidatas a ser las responsables de la motilidad espermática (Manjunath, 1999; Turner, 2003; Moura, 2006).

Durante los últimos 15 años se han realizado trabajos en diferentes países, enfocados al estudio de la estructura y función del conjunto de proteínas de la membrana espermática y del plasma seminal (Manjunath, 1987; Henricks et al., 1998; Lane et al., 1999; Gatti et al., 2000; Nauc y Manjunath, 2000; Gilles et al., 2002; Manjunath y Therien, 2002).

En el plasma seminal existen proteínas de especial importancia para la función fecundante del espermatozoide. El plasma seminal transporta al espermatozoide y le provee los insumos necesarios para alcanzar el oocito. Dado que el espermatozoide no posee capacidad fertilizante al momento de la eyaculación sino que la adquiere durante el tránsito a través del tracto genital de la hembra (Alumot, 1965; Yanahimachi, 1994; Berguer et al., 1996; Swamy, 2004), algunas de las proteínas contenidas en el plasma seminal, se unen a la célula espermática gracias a su afinidad con los lípidos presentes en la membrana plasmática, provocando una reconfiguración en la estructura de la misma, proceso conocido como capacitación. Una considerable cantidad de trabajos se han encaminado al estudio de un grupo de proteínas ácidas del plasma seminal, llamadas proteínas BSP (Bovine Seminal Plasma), las cuales se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide en el momento de la eyaculación y tienen un papel crucial en la capacitación espermática. Estas proteínas, son secretadas por las vesículas seminales y están caracterizadas con respecto a sus propiedades bioquímicas y estructurales. Las BSP A1, A2 y A3, tienen pesos moleculares entre 15000 y 16500 Dalton (Manjunath, 1993), y se sabe que incrementan significativamente la motilidad del espermatozoide cuando se unen a la parte media del mismo (Sánchez, 2004).

Así mismo, en semen ovino se determinó la presencia de proteínas específicas del plasma seminal que se adhieren al espermatozoide durante la eyaculación y que están relacionadas con efectos de protección y reversión del daño causado en la membrana de espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación (Cardozo, 2006). Estas proteínas designadas como RSVP14 y RSPV20, son sintetizadas exclusivamente por las vesículas seminales y se han designado como las responsables de gran parte del efecto protector frente al choque térmico por bajas temperaturas (Fernández et al., 2006). Estos últimos hallazgos evidenciaron que el semen ovino contiene importantes proteínas que pueden mejorar la habilidad fertilizante de los espermatozoides bajo ciertas condiciones desfavorables.

Aunque se ha probado que el efecto de la criopreservación sobre la membrana de los espermatozoides bovinos tiene un efecto deletéreo que afecta a la célula estructural y funcionalmente, las proteínas relacionadas con la protección y reversión contra el daño provocado por el choque térmico solo se han encontrado y probado en semen ovino. Hasta el momento no se ha reportado su uso en espermatozoides bovinos sometidos a criopreservación.

El presente trabajo pretende encontrar proteínas del plasma seminal relacionadas con la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide de toros Cebú y Sanmartinero sometidos a criopreservación, y probar el posible efecto que podría tener el adicionarlas a espermatozoides descongelados. Esto con el fin de contribuir al desarrollo de nuevas metodologías que involucren el uso de proteínas específicas para minimizar o revertir el daño en la membrana espermática ocasionado por la criopreservación.

Capítulo 1. Marco teórico

Proteínas de la membrana espermática

Los espermatozoides son células especializadas las cuales no pueden sintetizar proteínas después de la espermatogénesis. En la formación del espermatozoide, el citoplasma libera a los llamados “cuerpos residuales” que contienen ribosomas y otros organelos como el retículo endoplasmático, lisosomas y peroxisomas. Debido a la pérdida de éstos organelos, el espermatozoide carece de expresión de proteínas y de transporte vesicular (Sánchez, 2004). No obstante, la mayor cantidad de modificaciones en las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide suceden en diferentes etapas que comprenden desde la eyacuación hasta la interacción con la zona pelúcida.

Una vez ocurrida la eyacuación, el espermatozoide atraviesa el tracto genital de la hembra, donde se activa para luego unirse a la zona pelúcida del oocito. La activación de las células espermáticas (capacitación) induce cambios en la membrana plasmática que resultan en un incremento en la afinidad por la zona pelúcida (Brewis et al., 1999; Olivera et al., 2006 Revisado en: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias).

Los fluidos del oviducto son ricos en albumina y lipoproteínas de alta densidad (HDL), las cuales son capaces de remover el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. La remoción del colesterol permite que queden libres las proteínas de Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú cuales forman complejos de señalización para la reacción acrosómica. Lo anterior permite además la migración de algunas proteínas hacia la zona ecuatorial de la cabeza espermática, proceso necesario para la posterior fusión de las membranas del espermatozoide y el oocito (Gadella y Harrison, 2000; Williams, 2002). Se ha demostrado que la remoción del colesterol también activa los canales de calcio Ca^{++} . La entrada de Ca^{++} a la célula activa la proteína quinasa A1 (PKA1) la cual fosforila la tirosina de las proteínas (Urner y Sakkas, 2006). Este último sería entonces un cambio en la estructura y localización de las proteínas de la membrana plasmática, inducido por los factores presentes en el tracto genital femenino.

Una vez que los espermatozoides alcanzan el lugar de la fecundación, éstos tienen que atravesar las barreras que presenta el ovocito, entre las que se encuentran las células del *cúmulus*, la zona pelúcida y la membrana plasmática. Se conoce que la proteína llamada PH20 tiene actividad hialuronidasa gracias a la cual el espermatozoide es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico y atravesar la densa capa del *cúmulus* ayudado por su movimiento hiperactivo.

La unión del espermatozoide con la zona pelúcida del oocito es importante en la fecundación, ya que se considera un proceso de reconocimiento específico para cada especie. A pesar de la importancia de la unión del espermatozoide con la zona pelúcida, las proteínas involucradas en este proceso no han sido caracterizadas por completo en bovinos y ovinos, en comparación con la especie humana (Gadella, 2000 ; Travis y Kopf, 2002).

La reacción acrosómica se inicia inmediatamente después de la unión de un espermatozoide a la zona pelúcida del oocito. La membrana apical de la cabeza del espermatozoide comienza a fusionarse con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios, lo que resulta en la dispersión del contenido acrosomal. Durante la reacción acrosómica, se secretan enzimas proteolíticas e hidrolíticas para disolver la matriz de la zona pelúcida, con el fin de que el espermatozoide penetre al espacio perivitelino. Los espermatozoides cuyo acrosoma reacciona antes de llegar a la zona pelúcida se consideran inhábiles para la fecundación (Medina y Pérez, 1998; Bedoya, 1999; Alza y Jiménez, 2000).

De otra parte, se han caracterizado proteínas de anclaje al Glicofosfatidilinositol GPI y proteínas epididimal en el espermatozoide (Sakkas, 2003., Olivera et al., 2006 Revisado en: Revista Colombiana de Ciencias pecuarias), las cuales son las candidatas a ser las precursoras de la fusión de las membranas del espermatozoide y el oocito. Sin embargo aún no se ha podido dilucidar el mecanismo molecular de las interacciones entre estas proteínas. Con respecto a las proteínas unidas mediante GPI, se han hecho interesantes observaciones en el plasma seminal de diferentes especies. Estas observaciones demuestran que el plasma seminal contiene una población estable de proteínas que pueden ser enlazadas a la superficie de la membrana celular. Este tipo de modificaciones en la superficie celular probablemente hace a los espermatozoides más resistentes al ataque de los anticuerpos en el tracto genital de la hembra (Rooney, 1997).

Recientemente el grupo de Microbiología Molecular del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CORPOICA), adelantó estudios (resultados no publicados) del proteoma de la membrana de espermatozoides de razas criollas, encontrándose diferencias en los perfiles electroforéticos de las proteínas de las razas evaluadas. En espermatozoides de la raza Sanmartinero se detectaron 21 bandas de proteína, con pesos moleculares entre 6.5 y 65.3 kDa. Dos bandas de proteína, una de 49.3 y otra de 19.9 kDa, mostraron correlación ($p < 0.05$) con el porcentaje de espermatozoides motiles. La banda de 49.3 kDa presentó una correlación inversa ($r = -0.51$), mientras que la banda de 19.9 kDa correlacionó positivamente ($r = 0.7$) con la motilidad espermática.

Proteínas del plasma seminal

El plasma seminal es una compleja mezcla de secreciones originadas en los testículos, el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias. Este complejo contiene gran cantidad de polipéptidos de los cuales algunos se adsorben al espermatozoide y por consiguiente tienen un papel importante en la habilidad fertilizante del mismo.

Manjunath en 1993 reportó la presencia de cuatro tipos de proteínas designadas como BSP A1, BSP A2, BSP A3 Y BSP 30 kDa. Las A1 y A2 son idénticas en la composición de aminoácidos pero diferentes en glicosilación. Las BSP A1, A2 y A3 tienen pesos moleculares entre 15000 y 16500 Da. Las BSP A1, A2 y BSP 30 kDa son glicoproteínas mientras BSP A3 no tiene ningún carbohidrato. Las proteínas BSP A1 y A2 tienen exactamente la misma secuencia en su composición de aminoácidos pero las BSP A2 tienen de tres a cuatro veces menos galactosamina y ácido siálico. Estas dos en conjunto habían sido previamente llamadas gonadostatinas (Desnoyers et al., 1994) pero luego de determinar su estructura se designaron como proteínas PDC 109. Dentro del plasma seminal bovino, las proteínas PDC 109 son las más abundantes. Estas se adsorben a la membrana plasmática durante la eyaculación y tienen un papel importante en la preparación de la célula espermática para la fecundación. La PDC 109 es un polipéptido de 109 aminoácidos y contiene dos dominios de fibronectina tipo II precedidos por un dominio N terminal en el residuo 23. Esta proteína está presente en concentraciones de 15 a 25 mg/ml en el plasma seminal (Sanchez, 2004).

En el espermatozoide, los sitios de enlace de estas proteínas PDC son resistentes al efecto de las proteasas pero pueden ser extraídos con solventes orgánicos. La especificidad de unión se estudió analizando los enlaces de las proteínas con diferentes lípidos, lo que evidenció que las BSP reconocen específicamente fosfolípidos que contienen colina como fosfatidilcolina, esfingomiélin, lisofosfatidilcolina y plasmalógeno (Sanchez, 2004).

Se ha propuesto que las proteínas BSP cubren la superficie del espermatozoide por interacción con fosfolípidos que contienen fosforilcolina, esto previene la capacitación prematura del mismo (Manjunath y Sairam, 1987). El espermatozoide no capacitado viaja a través del tracto reproductivo de la hembra donde encuentra lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las HDL retienen a las proteínas BSP que están unidas a la superficie del espermatozoide y éstas a su vez secuestran el colesterol para luego dejar la superficie del espermatozoide. El mecanismo por el cual se da el flujo de colesterol cuando las HDL se enlazan a la membrana del espermatozoide aún no está claro. La pérdida de colesterol en la membrana causa una alteración en la permeabilidad y permite la entrada de calcio con la consiguiente activación de la fosfolipasa A2. Dado lo anterior, es posible que las proteínas BSP no solo previenen la capacitación del

espermatozoide sino que también promuevan la capacitación del mismo (Manjunath, 1993).

En Investigaciones del laboratorio de microbiología molecular del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB de CORPOICA se logró obtener el mapa referencial 2D-PAGE, de proteínas del plasma seminal de toros de la raza bovina Sanmartinero (Barajas et al., 2009). En éste se detectaron alrededor de 61 puntos de proteína, con puntos isoeléctricos entre 4.18 y 9.7, y pesos moleculares entre 11.5 y 75.9 kDa (figura 1). Solamente tres de los puntos encontrados tienen pls por encima de 7, de tal forma que el 95% de los puntos de proteína tienen pls ácidos o ligeramente ácidos.

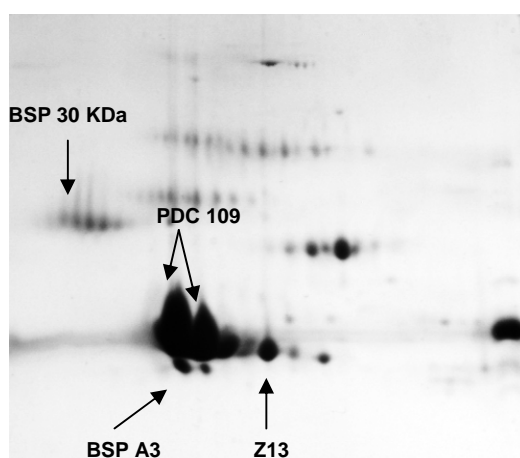


Figura 1 . Mapa de proteínas del plasma seminal de toro Sanmartinero, captado directamente del gel. Las flechas indican proteínas que coinciden en ubicación con BSP A1/A2 (PDC 109), BSP A3, BSP 30 kDa y Espermadhesina Z13. Tomado de: Barajas, 2009

En este trabajo se detectaron los puntos correspondientes a las BSP A1/A2 (MW entre 15 y 16.5 kDa; pls entre 4.7 y 5.2), y a la BSP A3 (MW de 13.4 kDa), reportadas en los trabajos de Manjunath (1993,1994, y 1997) y Gwathmey en el 2003, así como el punto correspondiente a la BSP 30kDa.

Los mapas electroforéticos de las proteínas del plasma seminal, obtenidos en el trabajo de Barajas presentan gran similitud con los presentados por Moura en el 2007, para toros de la raza Holstein. En este último trabajo se logró identificar proteínas como la osteopontina, espermadhesina y fosfolipasa A2 (figura 2), y se hace especial referencia a las proteínas ácidas del fluido seminal (aSPF), las cuales intervienen directamente en mecanismos dirigidos a prevenir daños en la membrana por estrés oxidativo o por daño inmune. Estas proteínas se incorporan al espermatozoide después de la eyaculación pero se pierden después de la capacitación, lo que permite pensar que no participan en la interacción espermatozoide-oocito (Moura, 2007).

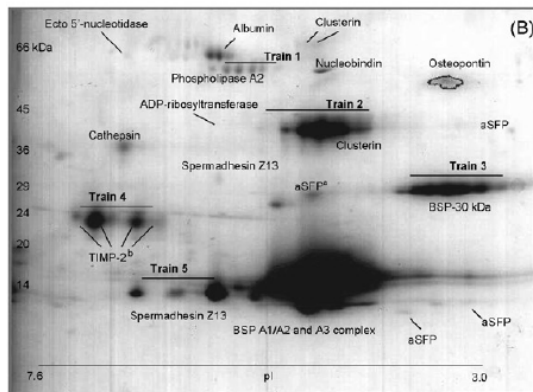


Figura 2. Mapa de proteínas del plasma seminal de toros Holstein. A la izquierda se indica el marcador de peso molecular. La flecha de abajo señala la dirección del gradiente de pH básico (izquierda) y ácido (derecha). Se identifican grupos de proteínas BSP A1/A2 (PDC 109), BSP A3, BSP 30 kDa , Espermadhesina Z13, clusterina y albúmina entre otras. Tomado de: Moura., 2007.

Así mismo en el trabajo del laboratorio de Microbiología molecular del CBB CORPOICA (Barajas et al., 2009), se estableció el mapa referencial 2D-PAGE de las proteínas en el plasma seminal de la raza Cebú. Sobre el mapa electroforético se detectaron aproximadamente 36 puntos de proteína, con pesos moleculares entre 13.9 y 66.2 kDa, y pls entre 4.1 y 9.8 (figura 3). El 89% de las proteínas tienen pI por debajo de 7, lo que indica que la gran mayoría tiene un pH ácido. Los mapas electroforéticos del plasma seminal de toros cebú se han desarrollado para correlacionar la cantidad específica de los puntos de proteínas con los valores de los parámetros de fertilidad, como número de vacas preñadas, en diferentes épocas de apareamiento, obteniéndose correlaciones hasta del 0.79 ($p < 0.05$) de un conjunto de 27 puntos (figura 3), con toros identificados con alto potencial fertilizante (Roncoletta y Da Silva, 2003).

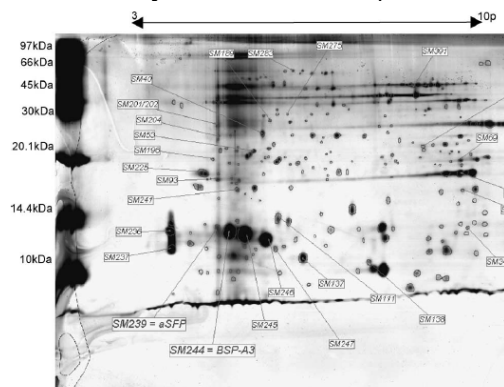


Figura 3. Mapa electroforético de plasma seminal de toro Cebú. A la izquierda se indica el marcador de peso molecular. La flecha de arriba señala la dirección del gradiente de pH básico (derecha) y ácido (izquierda). Se señala el conjunto de puntos que tiene correlación con toros cuyo semen posee alto potencial fertilizante. Tomado de: Roncoletta., 2006

Relación de las proteínas del plasma seminal con la reversión del daño en la membrana espermática ocasionado por los procesos de criopreservación

Las investigaciones han evidenciado que el plasma seminal es de suma importancia para mantener la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Barrios y Perez, 2000), además de incrementar la resistencia al daño ocasionado a la membrana espermática por choque térmico (Baas y Molan, 1983). En equinos, existe evidencia de que el plasma seminal previene la capacitación prematura del espermatozoide y lo protege contra estrés oxidativo. Sin embargo, el plasma seminal también tiene efectos deletéreos en procesos de congelación de semen (Pruit y Arns, 1993). Igualmente, se ha indicado que existen proteínas que revierten el efecto del choque térmico en el plasma seminal ovino y algunas investigaciones han demostrado mediante el uso de electroforesis SDS 2D PAGE, que las proteínas del plasma seminal, las BSP, disminuyen después de la congelación lo que puede indicar un nuevo papel de estas proteínas en procesos de criopreservación (Barrios, 2000; Cardozo, 2006). Estos descubrimientos indican que el plasma seminal es una mezcla compleja que contiene una amplia variedad de componentes que afectan la viabilidad y la sobrevivencia de la célula espermática. En el plasma seminal se han evidenciado diferencias en perfiles de proteínas en toros con diferentes tasas de fertilidad. Tales investigaciones han demostrado cambios en las células espermáticas, mediados por interacciones con proteínas del plasma seminal (Metz y Berguer, 1990), y han confirmado la adsorción de grandes cantidades de proteínas del plasma seminal a la membrana de espermatozoides de carnero, toro y cerdo. Los espermatozoides de cordero son más susceptibles a choque térmico por frío que otras especies (Hold y Nord, 1984; Fisher y Fairful, 1989), y se ha reportado la presencia de un tipo de proteínas en el plasma seminal de especies ovinas que, aunque están en menor proporción a las BSP, son de especial importancia dado que mantienen la integridad de la membrana plasmática y pueden, tanto reparar como prevenir los daños en el esperma luego de un choque térmico por frío (Barrios y Perez, 2000). Estas proteínas designadas como RSVP14 y RSPV20, son sintetizadas exclusivamente por las vesículas seminales y son las responsables de este efecto protector (Fernández et al., 2006). Dichas proteínas fueron resueltas posteriormente mediante electroforesis 2D PAGE (Cardozo y Fernández, 2006). Estos últimos hallazgos muestran que el semen ovino contiene importantes proteínas que pueden mejorar la habilidad fertilizante de los espermatozoides bajo ciertas condiciones desfavorables.

Con respecto al acrosóma, se sabe que existe una marcada desintegración de éste cuando se somete a choque térmico por frío y se ha demostrado que los daños más significativos en el acrosóma, ocurren cuando el espermatozoide se somete a temperaturas entre los 35 y 23 °C y el efecto de este choque también se ve evidenciado en la disminución de la motilidad espermática (Almquist, 1979). En ovinos, se ha estudiado el efecto de la adición de proteínas del plasma seminal en la estabilidad e integridad de la membrana plasmática (Barrios y

Perez, 2000; Cardozo, 2006). Los procedimientos para determinación de este tipo de efectos, requieren de selección espermática por medio de swim up. Así mismo, las proteínas del plasma seminal se separan por medio de cromatografía líquida. En estos estudios, se evidencia claramente que existen proteínas del plasma seminal con efectos protectores de la membrana espermática y que fracciones con proteínas de 14 kDa y 20 kDa pueden ser las responsables de prevenir y/o revertir el daño a la membrana de las células (figura 4).

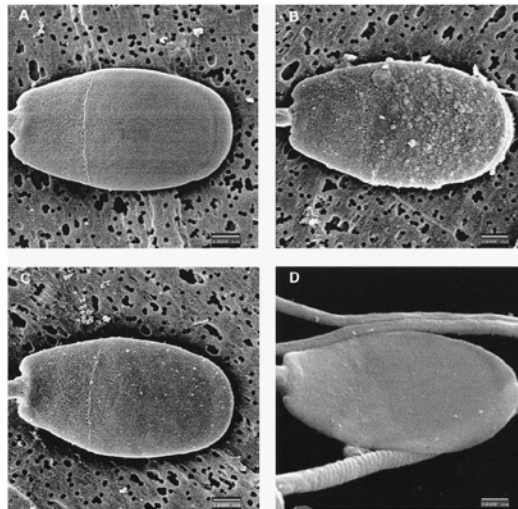


Figura 4. Microscopia electrónica de espermatozoides de carnero A) obtenidos por swim up, B) sometidos a choque térmico, C) sometidos a choque térmico e incubados con 0,7 mg de proteínas de plasma seminal, D) sometidos a choque térmico e incubados con 0,7 mg de proteínas de plasma seminal de la sexta fracción de proteínas. Magnificación de 13000X . Tomado de: Barrios y Perez., 2000.

Proteínas del plasma seminal

El plasma seminal es un complejo de proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú epidídimo y las glándulas accesorias. Este complejo contiene gran cantidad de polipéptidos de los cuales algunos se unen al espermatozoide y por consiguiente tienen un papel importante en la habilidad fertilizante del mismo. En los toros, se ha demostrado que las proteínas del plasma seminal potencializan la respuesta del espermatozoide a la zona pelúcida (Manjunath, 1994).

En 1993, Manjunath reportó cuatro tipos de proteínas designadas como BSP A1, BSP A2, BSP A3 Y BSP 30KDa. Las A1 y A2 se denominaron previamente como gonadostatinas (Desnoyers et al., 1994) pero luego de determinar su estructura se designaron como proteínas PDC 109. Dentro del plasma seminal bovino, las proteínas PDC 109 son las más abundantes. Estas se unen a la membrana plasmática durante la eyaculación y tienen un papel importante en la preparación de la célula espermática para tomar lugar en la fecundación. La purificación de las PDC 109 y la determinación de su estructura han sido reportadas desde hace unos años. Esta es un polipéptido de 109 aminoácidos y contiene dos dominios de fibronectina tipo II precedidos por un dominio N terminal en el residuo 23. Esta

proteína está presente en concentraciones de 15 a 25 mg/ml en el plasma seminal. Los análisis estructurales han revelado que la cadena peptídica de las PDC 109 está alineada en dos pliegues beta antiparalelos que se extienden perpendicularmente, y dos espirales irregulares soportan un largo sitio hidrofóbico (figura 5). Los dominios de fibronectina demuestran una habilidad especial para unirse a los lípidos (Sanchez, 2004). En diferentes trabajos se ha demostrado que las proteínas BSP se adhieren a la membrana plasmática del espermatozoide.

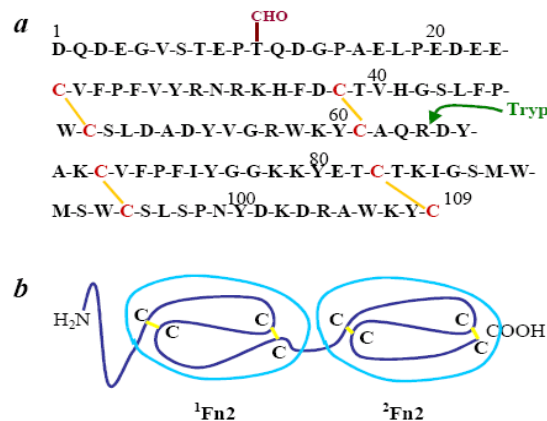


Figura 5. Estructura primaria y organización de los dominios de fibronectina de las PDC 109. a. estructura primaria de las PDC 109. b. organización de los dominios de fibronectina, los dos dominios Fn2 son muy similares pero no idénticos. Tomado de: Musti, S. Current Science vol 87: 2004

El papel de las proteínas BSP puede estar relacionado con la modulación lipídica que ocurre en la membrana durante la capacitación y la reacción acrosómica. Se ha propuesto que las proteínas BSP cubren la superficie del espermatozoide por interacción con fosfolípidos que contienen fosforilcolina, esto de capacita al espermatozoide y previene la capacitación prematura del mismo. De otro lado, es posible que por el contenido de glicoconjugados de fucosa en la superficie de las células epiteliales del oviducto, las PDC 109 también preparen al espermatozoide para unirse al epitelio oviductal (Souza, 2008).

La proporción de las proteínas BSP tanto en plasma seminal como en el espermatozoide bovino han sido cuantificadas mediante radioinmunoanálisis RIA (Manjunath, 1997), encontrando que las BSP representan del 40 al 57 % de las proteínas totales del plasma seminal (BSP A1 y A2: de 25 a 47%, BSP A3: de 3 a 5% y BSP 30 KDa: de 3 a 7%) y solo de 4 a 6% de las proteínas del espermatozoide (BSP A1 y A2: de 2.5 a 4%, BSP A3: de 0.4 a 0.9 % y BSP 30 KDa: de 0.5 a 1%).

Además de las proteínas PDC 109, se ha reportado la presencia de otro tipo de proteínas en el plasma seminal de especies ovinas. Estas proteínas, aunque están en menor proporción a las BSP, son de especial importancia dado que mantienen la integridad de la membrana plasmática y pueden, tanto reparar

como prevenir los daños en el espermatozoide luego de un shock térmico por frío. Estas proteínas designadas como RSVP14 y RSPV20, sintetizadas exclusivamente por las vesículas seminales (Barrios y Pérez, 2000) y determinadas mediante electroforesis 2D PAGE, son las responsables de este efecto protector (Fernández y Col., 2006). Estos últimos hallazgos no solo muestran que el semen ovino contiene importantes proteínas que pueden mejorar la habilidad fertilizante de los espermatozoides bajo ciertas condiciones desfavorables (Cardozo, 2006), sino además abren la puerta al desarrollo de alternativas moleculares para el mejoramiento de la habilidad fecundante del espermatozoide.

Protección de la membrana del espermatozoide por las proteínas del plasma seminal

En algunas investigaciones se ha estudiado la protección que confiere el plasma seminal a los espermatozoides que han sido sometidos al llamado “cold shock” o choque térmico por frío. Este último es un fenómeno muy común en procesos de criopreservación y debido al cual, se presentan considerables disminuciones en la viabilidad y motilidad de los espermatozoides durante y después de la congelación. El efecto del choque térmico produce, en diferente grado, pérdidas en la motilidad y en la capacidad fertilizante si las células son refrigeradas rápida o lentamente a la misma temperatura (figura 6). Los ensayos cuantitativos muestran que no se provoca daño a las células espermáticas si la temperatura del semen es llevada hasta 5 °C, en un intervalo de al menos 2 horas. Ésta baja gradual de temperatura es la base del éxito en la criopreservación de semen. Sin embargo, el efecto del choque térmico en el espermatozoide no es instantáneo y el daño puede detenerse por un recalentamiento (Walton, 1957).

En 1974, Lindholmer describió la importancia del plasma seminal en la motilidad de espermatozoides de humano luego de ser criopreservados. Sin embargo, fue en el 2004, cuando Jobim caracterizó proteínas del plasma seminal relacionadas con la resistencia del espermatozoide bovino al choque térmico. En este trabajo, se realizaron perfiles electroforéticos bidimensionales de plasma seminal de toros *Bos taurus* y *bos indicus* para luego relacionarlos con la facilidad de congelación del semen. Luego de establecer los valores de alta y baja congelabilidad de acuerdo al número de pajillas descartadas, se logró concluir que las proteínas ácidas del plasma seminal (aSPF) y la clusterina correlacionaron con una alta congelabilidad. De otra parte, se determinó que 25 proteínas correlacionaron con una baja congelabilidad.

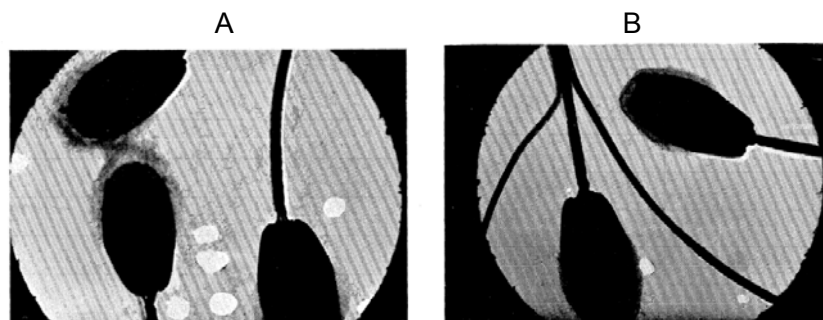


Figura 6. Microscopía electrónica de: A, espermatozoides sometidos a 5°C de forma intempestiva y B, espermatozoides sometidos a 5°C de forma gradual. Tomado de : Walton A., Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, Vol. 147, No. 929. 1957

Así mismo, se desarrollaron investigaciones con semen de ovino, en donde las células espermáticas se seleccionaron por *swim up* para luego ser sometido a choque térmico (Barrios y Pérez, 2000). Posteriormente, los espermatozoides seleccionados se incubaron con proteínas del plasma seminal y se analizaron con marcadores de fluorescencia y microscopía electrónica. Se encontró que las proteínas del plasma seminal que se unen a la membrana del espermatozoide, modifican las características funcionales de los espermatozoides demostrando que el daño estructural inducido por las bajas temperaturas, se revierte durante de la incubación con proteínas de plasma seminal, lo cual indica una restauración en la membrana de las células espermáticas. La adsorción de estas proteínas, según Barrios, es un proceso que depende de la concentración de las mismas en el medio de incubación.

El fraccionamiento de estas proteínas del plasma seminal, mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño, proporcionó tres fracciones capaces de revertir el efecto del choque térmico. Después de la incubación con estas fracciones, la microscopía electrónica demostró que al menos el 50 % de los espermatozoides sometidos a choque térmico presentó una restauración en la apariencia de su membrana, comparado con la apariencia original, posiblemente debido a la presencia de una proteína de 20 Kda presente en las fracciones de plasma seminal usadas para la incubación y que podría ser la responsable de recuperar la características de permeabilidad de una célula espermática viable.

Criopreservación de semen y daños en la membrana del espermatozoide

Desde los años 50, cuando se congelaron espermatozoides bovinos por primera vez, se han probado numerosas técnicas de criopreservación. A pesar de los avances, los efectos de la criopreservación sobre la viabilidad del espermatozoide siguen siendo devastadores y se estiman pérdidas de más del 50 % de la viabilidad en el semen descongelado (Walton, 1957).

Las investigaciones en este aspecto, permitieron en 1969 aislar una proteína que provenía de un pez que podía sobrevivir a la congelación. Estas proteínas específicas después se conocieron como proteínas anticongelantes (Devries y Wohlschlag, 1969). Se demostró que estas proteínas pueden proteger las células de muchas formas como la modificación de la formación de cristales durante los procesos de congelación y además tienen la capacidad de interactuar con la membrana plasmática a bajas temperaturas. Se han identificado cinco proteínas anticongelantes (Antifreeze proteins o AFPs) y 3 de estas (AFP I, AFP III y AFGP) están disponibles comercialmente. Estas proteínas anticongelantes se unen a los cristales de hielo, responsables del daño en la integridad de las membranas celulares, e inhiben la recrystalización de los mismos. La AFP I consiste en una larga alfa hélice simple de 3.5 a 4.2 kDa con dos caras en su estructura tridimensional, una hidrofóbica y otra hidrofílica (Duman y Devries, 1976). Las AFP tipo II son proteínas globulares ricas en cisteína que contienen cinco puentes disulfuro (Ng y Hew, 1992). Por su parte las proteínas AFP tipo III exhiben características similares a las AFP tipo I con un tamaño de 6 kDa aproximadamente.

Aunque se había probado la adición de estas proteínas anticongelantes en medios de criopreservación de semen de ratones y primates, la adición a medios de criopreservación de semen bovino se evaluó recientemente (Prathalingam, 2006). En este estudio se evaluó el efecto de la adición de AFP I y AFP III en la viabilidad espermática, la resistencia osmótica y la integridad del acrosoma de semen bovino descongelado. Las proteínas se adicionaron en concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 mg/ml, lo que resultó en un incremento de la resistencia osmótica y una disminución en la ruptura mecánica de los espermatozoides debido a que las proteínas anticongelantes dieron una reorientación a los cristales formados por el medio de criopreservación. Sin embargo, los efectos en la viabilidad y la integridad del acrosoma no fueron concluyentes.

Electroforésis sds- bidimensional como herramienta para la separación de las proteínas

En la actualidad, la proteómica es aceptada como el método más eficaz para el análisis de proteínas como producto de la expresión genética. La razón por la cual los análisis proteómicos resultan útiles es que, en contraste con la genómica la cual es relativamente estática e idéntica en muchas de las células somáticas de un organismo, la expresión de las proteínas es un estado de flujo dinámico constante que responde a estímulos internos y externos, de manera que se acerca más al análisis de los procesos celulares. Sin embargo, lo anterior hace que su estudio sea más lento y complejo.

La electroforésis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D- PAGE) es el centro de las investigaciones en proteómica dado que es capaz de separar simultáneamente gran cantidad de proteínas. La técnica envuelve la separación

de cientos de proteínas, en primera instancia, por su punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque (IEF). Mediante el uso de un gradiente de pH, las proteínas se separan hasta que alcanzan una posición estacionaria en la cual su carga neta se hace cero, punto que se conoce como isoeléctrico. De otro lado, en la segunda dimensión las proteínas se separan de acuerdo con su peso molecular relativo, haciendo pasar cada proteína por una matriz polimérica que constituye la base de la separación dado que las moléculas con mayor peso molecular tendrán mayor dificultad para atravesar la matriz de poliacrilamida.

La electroforesis 2D se desarrolló por primera vez por O'Farrell en 1975 y desde entonces ha sufrido ciertos cambios que la han hecho reproducible y sensible. El principal cambio en el protocolo original fue la introducción de tiras de gradiente de pH inmovilizado (Gorg, 1988), lo cual resolvió el problema de la inestabilidad y la baja reproducibilidad. En otro aspecto, la 2D-PAGE es una tecnología que requiere cierto nivel de experiencia y habilidad manual para obtener reproducibilidad. Esto significa que los patrones de proteínas no son fáciles de comparar en detalle, entre geles elaborados en diferentes laboratorios (Fey, 2001). Aunque el análisis de los geles asistido por programas de computadora ha resuelto muchos de los inconvenientes a cerca de este tema, el componente manual aun sigue siendo uno de los inconvenientes metodológicos más discutidos.

Finalmente, otro de los debates más importantes que se ha generado alrededor de esta técnica es la posibilidad de detectar e identificar proteínas, como receptores, señales de traducción y proteínas regulatorias que tienen baja concentración. El ejemplo más claro está en las levaduras, en las que la secuencia de los codones puede correlacionar o no con los niveles de expresión de las proteínas encontradas. En este sentido los resultados obtenidos en diferentes trabajos son contradictorios y aunque se ha intentado resolver las inquietudes adaptando técnicas como espectrometría de masas, aun no se ha llegado a un consenso unificado (Gorg, 1998).

Referencias

ALZA, L., JIMÉNEZ, A. Evaluación de la fertilidad del semen congelado de la raza Cebú, Blanco Orejinegro y Costeño con Cuernos mediante las pruebas de penetración espermática de oocitos bovinos *in vitro* y reacción acrosómica *in vitro*. Trabajo de grado Medicina Veterinaria. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2000, 170 p

ALMQUIST, LO. Effect of Cold Shock after Thawing on Acrosomal Maintenance and Motility of Bovine Spermatozoa Frozen in Plastic Straws. *Journal of Dairy Science*. 1979, 59: No. 10

ALUMOT, E., SCHINDLER, H. Transaminases in the epididymal fluid of the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1965, 10: 261-267

BAAS, JW., MOLAN, PC., SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1983, 68: 275–80

BARAJAS, D P., COY, P., VELÁSQUEZ, JG., RUEDA, F., HERRERA, R., CARDOZO, J.A. Proteínas del plasma seminal asociadas con la fertilidad de toros criollos Sanmartinero y Cebú en condiciones del trópico colombiano. *Memorias Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe SIRGELAC*. 2009, p 153-154

BARRIOS, B., PEREZ-PE, R., GALLEGU, M. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 2000, 63: 1531-1537

BEDOYA, D. Inducción de la reacción acrosómica *in vitro* para la evaluación de la capacidad fertilizante de espermatozoides criopreservados en toros de las razas Sanmartinero y Cebú Brahman. Bogotá. Trabajo de grado Medicina Veterinaria. Bogotá: Universidad de | Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú 1999, 140 p

BERGER, T., ANDERSON, DL., PENEDO, MCT. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Animal Reproduction Science*. 1996, 44: 231-239

BLOTTNER, S., NEHRING, H., TORNER, H. individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin *in vitro*: Relationship to fertility. *Theriogenology*. 1990, 34: 3-13

BREWIS, IA., WONG, CH. Sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Reviews of Reproduction*. 1999, 4: 135-142

CARDOZO, JA., FERNANDEZ-J., CEBRIAN-PEREZ, JA., MUIÑO-BLANCO, T. Identification of RSVP14 and RSVP20 Components by Two-dimensional Electrophoresis and Western-blotting. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006, 10: 15-21

CORREA, J., HEERSCHKE, G., ZAVOS, P. Sperm membrane functional integrity and response of frozen thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology*. 1997, 47: 715-721

CORREA, J., ZAVOS, P. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*. 1994, 42: 351-360

DESNOYERS, L., THERIEN, I., MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Molecular and Reproduction Development*. 1994, 18: 425-435

DEVRIES, AL., WOHLSCHLAG, DE. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*. 1969, 163: 1074–1075

DUMAN, D., DEVRIES, AL. Isolation, characterization and physical properties of protein antifreezes from the Winter Flounder *Pseudopleunectus Americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1976, 54: 375–380

FERNANDEZ, J., GALLEGO, M., BARRIOS, B., CEBRIAN-PEREZ, JA. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. *Reproduction*. 2006, 132: 588-595

FEY, S. 2D or not 2D. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001, 2: 23-26

FISER, PS., FAIRFULL, RW. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1989, 26: 64–69

GADELLA, M., HARRISON, RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*. 2000, 127: 2407-2420

GADELLA M. Dynamics of the mammalian sperm in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, 1469: 197-235

GATTI, JL., DRUART, X., SYNTIN, P., DACHEUX, JL. Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation dependent sperm glycoproteins. *Biology of reproduction*. 2000, 62: 950-958

GILLES, F., LESSARD, C., SULLIVAN, R. Selected proteins of “Prostasome like-particles” from epididymal Cauda fluid are trasfered to epidydimal caput spermatozoa in bull. *Biology of reproduction*. 2002, 67: 308-313

GORG, A. The current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988, 9: 531-546

GORG, A. 2-D electrophoresis with immobilized pH gradients using IPG for isoelectric focusing system. *Proteomics*. 1998

GWATHMEY, T. M. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*. 2003 69: 809-815

HENRICKS, D., KOUBA, A., LACKEY, B., BOONE, W., GRAY, S. Identification of insulin-like Growth factor I bovine seminal plasma and its receptor on Spermatozoa: Influence of sperm motility. *Biology of Reproduction*. 1998, 59: 330-337

HOLT WV, NORTH RD. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *Journal Experimental Zoology*. 1984, 230: 473-483

HENAULT, M. KILLIAN, G. Effects of sperm preparation and bull fertility on *in vitro* penetration of zona-free bovine oocytes. *Theriogenology*. 1995, 43: 739-749

JOBIM, M., OBERST, E. BSP A1/A2 like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*. 2005, 63: 2053-2062

LINDHOLMER L. The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biology of reproduction*. 1974, 10: 533-542

MANJUNATH, P., SAIRAM, M. Purification and Biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP A1, A2 y A3) in bovine seminal plasma. *Journal of Biochemistry*. 1987, 241: 685-692

MANJUNATH, P. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosciences of reproduction*. 1987, 7: 231-238

MANJUNATH, P., CHADONET, E. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1993, 49: 27-37

MANJUNATH, P., THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids binding proteins in sperm membrane lipids modification that occurs during capacitation. *Journal of reproduction and immunology*. 2002, 53: 109-119

MARTINEZ, R. LUQUE, O. Evaluación de la fertilidad del semen congelado de bovino criollo Sanmartinero y Cebú (Brahman) mediante la prueba de penetración espermática en oocitos bovinos *in vitro*. Trabajo de grado Medicina Veterinaria. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1996, 160 p

MARTINEZ, N. RODRIGUEZ, E. determinación *in vitro* de la capacidad fertilizante de espermatozoides de toros de las razas Blanco orejinegro, Costeño con cuernos, Romosinuano y Sanmartinero mediante la técnica de penetración espermática en oocitos bovinos. Trabajo de grado de licenciatura en Biología. Bogotá: Universidad Distrital Francisco Jose de Caldas, Facultad de Ciencias y educación, 2002, 70 p

- MEDINA, F. PEREZ, E. Efecto de la temperatura sobre la penetración espermática y fertilización *in vitro* en toros de las razas Romosinuano, Holstein, y Brahman en oocitos de matadero. Bogotá. Trabajo de grado Medicina Veterinaria y Zootecnia: Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 1998, 176 p
- METZ KW, BERGER T, CLEGG ED. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. *Theriogenology*. 1990, 34: 691–700
- MOURA, A. CHAPMANA, D. KILLIAN A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*. 2007, 98
- NAUC V, MANJUNATH P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification seminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction*. 2000, 63:1058–66
- NG N, HEW C. Structure of antifreeze polypeptide from sea raven: Disulfide bonds and similarity to lectin-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1992, 267: 16069-16075
- O'FARRELL PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1975, 10:4007-4021
- OLIVERA, M., RUIZ, T., TARAZONA, A. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006,19: 426-436
- PRATHALINGAM, N. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*. 2006, 66:1894–1900
- PRUIT JA, ARNS MJ, POOL KC. Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37 8C) and cold storage (5 8C). *Theriogenology*. 1993, 39: 291–296
- RONCOLETTA. M., DA SILVA, CARVALHO M., Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Animal Reproduction Science*. 2003, 91:77–87
- Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú. *Clinical Investigation*. 1997, 97:1675–1686
- SANCHEZ, S. Interaction of PDC 109, the major secretory proteins from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane. *Journal of Andrology*. 2004, 25: 234-244
- SAKKAS D, LEPPENS-LUISIER G, LUCAS H, CHARDONNENS D, CAMPANA A, FRANKEN DR. Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biology of Reproduction*. 2003, 68: 1463-1469

SWAMY M. interaction of bovine seminal plasma proteins with model membranes and sperm plasma membranes. *Current Science*. 2004, 87: 103-211

TRAVIS AJ, KOPF GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *Journal of Clinical Investigation*. 2002, 110: 731-736

URNER, F., SAKKAS, D. Protein fosforilation in mammalian spermatozoa. *reproduction*. 2003, 125: 17-26

WALTON, A. Cold Shock of Spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1957, 147, No. 929: 508-509

WILLIAMS CJ. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*. 2002, 8: 313-321

WITHFIELD, C.H. PARKINSON, T.S. Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome relations by heparin. *Theriogenology* 1992, 38:11-20

YANAGIMACHI R., "The Phisiology of Reproduction", Ed. J.D Neills. 1994

Objetivos

General

Identificar posibles diferencias en el contenido proteico del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú, relacionadas con la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación

Específicos

- Determinar mediante electroforésis bidimensional las proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú relacionadas con la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide.
- Separar por cromatografía las fracciones proteicas del plasma seminal y relacionarlas con la viabilidad del espermatozoide
- Evaluar el efecto de la adición de fracciones proteicas de plasma seminal en la protección de la membrana plasmática de espermatozoides de toros de razas Sanmartinero y Cebú sometidos a procesos de criopreservación

Capítulo 2

Proteínas de plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la calidad seminal

Resumen

El objetivo de esta investigación fue determinar las diferencias en los perfiles electroforéticos bidimensionales de plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú y relacionar cada punto de proteína con los parámetros de calidad seminal. Los porcentajes de viabilidad y concentración espermática fueron mayores en semen de toros Sanmartinero ($p > 0.05$ y $p < 0.001$ respectivamente). Los mapas electroforéticos de plasma seminal de todos los toros presentaron puntos cuyas características de peso molecular y pH coinciden con las características de proteínas como BSP A1/A2, A3, BSP de 30 kDa, Clusterina, Espermadhesina Z13, Inhibidor de metaloproteinasas TIMP-2 y proteínas ácidas del fluido seminal aSFP. Los mapas de plasma seminal de Sanmartinero presentaron 75 puntos, 11 exclusivos de ésta raza. De otro lado, los mapas de proteínas de plasma seminal de Cebú evidenciaron 67 puntos, 14 solo se encontraron en ésta raza. Las cantidades relativas de diez puntos presentaron diferencias ($p < 0.05$) cinco con mayor cantidad en Sanmartinero y cinco en Cebú. En el plasma seminal de toros Sanmartinero, un punto de proteína de peso molecular 16.20 kDa y punto Isoeléctrico 5.5, evidenció correlación con la viabilidad espermática ($r = 0.64$ $p < 0.001$). Este punto tiene semejanzas en las características reportadas en bases de datos internacionales (NCBI NR) para proteínas BSP A1/A2, de las cuales se ha reportado que están involucradas en la regulación de la capacitación espermática en semen bovino. Se logró concluir que las características de las proteínas presentes en el plasma seminal de toros Sanmartinero podrían explicar en parte los valores superiores de calidad seminal de estos toros.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the differences between two-dimensional electrophoretic profiles of seminal plasma from Sanmartinero and Cebu bulls, and relate each spot with semen quality parameters. The viability and sperm concentration percentages were higher in semen of Sanmartinero bulls ($p > 0.05$ and $p < 0.001$ respectively). Electrophoretic maps of seminal plasma from all bulls had spots with similar features of proteins as BSP A1/A2, A3, BSP 30 kDa, clusterin, Espermadhesin Z13, Tisular metalloproteinase inhibitor TIMP-2 and acidic seminal fluid proteins aSFP. Maps from Sanmartinero seminal plasma presented 75 spots, 11 exclusive of this breed. On the other side, the maps of

seminal plasma proteins from Cebu bulls had 67 spots, 14 were found only in this breed. The relative amounts of ten spots had differences ($p < 0.05$) five with more relative quantity in Sanmartinero seminal plasma and five in Cebu seminal plasma. In the map of proteins from Sanmartinero bulls, one spot with molecular weight 16.20 kDa and isoelectric point 5.5, showed correlation with sperm viability ($r = 0.64$ $p < 0.001$). This spot has similarities in the pattern reported in international databases (NCBI NR) for BSP A1/A2 proteins, reported as involved in the regulation of sperm capacitation. Seminal plasma proteins from Sanmartinero bulls may partly explain their higher semen quality.

Introducción

Uno de los problemas que más afecta los índices productivos de los principales sistemas de explotación ganadera, continúa siendo la baja fertilidad del macho bovino. El desempeño del toro reproductor incide de forma muy importante en los índices reproductivos del hato y en tal sentido, algunos trabajos de investigación se han encaminado al desarrollo de elementos metodológicos que permitan evaluar con mayor criterio y confiabilidad la fertilidad del macho reproductor. Se ha reportado que los métodos convencionales para evaluar la fertilidad de los toros, tales como la determinación de la concentración espermática, volumen del eyaculado, motilidad y morfología espermática, no siempre predicen en debida forma la fertilidad *in vivo* del animal. En contraste, los estudios *in vitro* que se han adelantado para evaluar la capacidad fecundante del espermatozoide, como inducción de la reacción acrosómica, porcentaje de oocitos penetrados y el test hiposmótico entre otros, han mostrado gran correlación con las tasas de no retorno al estro a los 90 días y con los porcentajes de concepción al primer servicio (Bedoya, 1999; Grasa et al., 2004).

Investigaciones realizadas en CORPOICA (C.I Tibaitatá y C.I La libertad) han demostrado que toros reproductores de las razas criollas como Sanmartinero, Romosinuano, Costeño Con Cuernos y Blanco Orejinegro, presentan altos índices de penetración de oocitos *in vitro* comparados con toros de razas foráneas e introducidas como Cebú y Holstein. Aunque se sabe del buen comportamiento reproductivo de los machos bovinos criollos, aun no se conoce con exactitud las razones de su fertilidad superior.

Durante los últimos años se han realizado una serie de investigaciones encaminadas hacia el estudio de la estructura y función del conjunto de proteínas del plasma seminal que se han propuesto como candidatas a convertirse en posibles marcadores de fertilidad bovina. El plasma seminal está compuesto por un conjunto de secreciones que forman el vehículo que transporta la célula espermática y del cual incorpora muchos de los componentes necesarios para su motilidad y supervivencia. Dado que el espermatozoide no posee capacidad fertilizante al momento de la eyaculación sino que la adquiere durante el tránsito a través del tracto genital de la hembra (Swamy, 2004), algunas de las proteínas contenidas en el plasma seminal, se adhieren a la célula espermática gracias a su afinidad con los lípidos presentes en la membrana plasmática, lo que estimula una reconfiguración en la estructura de la misma, proceso conocido como capacitación. Una considerable cantidad de trabajos, se han encaminado al estudio de un grupo de proteínas ácidas del plasma seminal, llamadas proteínas BSP (Bovine Seminal Plasma), las cuales se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide en el momento de la eyaculación y tienen un papel crucial en la capacitación espermática. Éste grupo de proteínas ha sido separado mediante diversas técnicas y su caracterización se ha desarrollado en su mayoría a través de electroforesis bidimensional y espectrometría de Masas. Se ha descrito que son secretadas por las vesículas seminales y sus características bioquímicas y

estructurales están bien caracterizadas. Las BSP A1, A2 y A3, tienen pesos moleculares entre 15000 y 16500 Dalton (Manjunath, 1993), y se sabe que incrementan significativamente la motilidad del espermatozoide cuando se unen a la parte media del mismo (Sanchez, 2004).

Las separaciones electroforéticas de proteínas de plasma seminal de toros de diferentes razas pueden otorgar una idea de las razones de la existencia de toros más fértiles que otros y la presencia, ausencia o cantidad relativa de proteínas específicas podrían explicar diferencias en parámetros de calidad seminal.

El presente escrito evidencia las diferencias en los perfiles electroforéticos bidimensionales de plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú, al mismo tiempo que pretende demostrar la relación existente entre las proteínas del plasma seminal y la calidad espermática.

Materiales y métodos

Unidades experimentales y toma de muestras

Esta investigación se adelantó con 10 toros de la raza criolla Sanmartinero y 10 de la raza Cebú. Los animales permanecieron en el centro de investigación La Libertad, ubicado en la ciudad de Villavicencio en el departamento del Meta. Los toros seleccionados tenían entre 3 y 4 años de edad, y estuvieron siempre en adecuadas condiciones de salud. A cada toro se le colectó tres muestras de semen mediante electroeyaculación con un intervalo de 7 días entre cada colecta. Todas las colectas de semen se realizaron en épocas con lluvias predominantes comprendidas entre los meses de mayo y julio, meses en los que se reportan los mayores promedios de precipitación según reportes del Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios Ambientales IDEAM (figura 7).

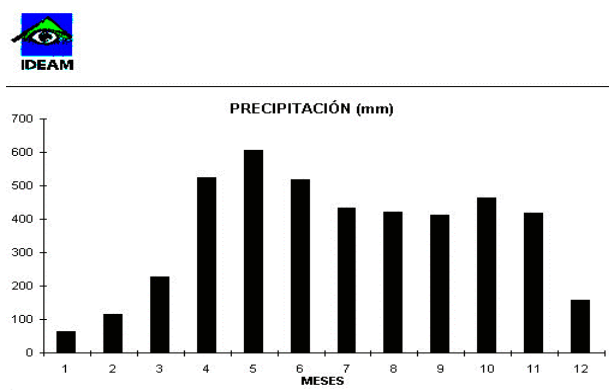


Figura 7. Reporte del IDEAM de los promedios de precipitación mensuales. Mayo y Junio presentan los promedios de precipitación (mm) más altos. Tomado de: IDEAM pagina Web, www.ideam.gov.co

Los animales permanecieron bajo condiciones de pastoreo en praderas de *Brachiaria decumbens* y todos bajo las mismas condiciones de alimentación y manejo.

Antes de determinar las proteínas del plasma seminal mediante electroforesis bidimensional, se determinaron los parámetros convencionales de calidad seminal en semen fresco, como viabilidad, motilidad masal, motilidad individual y concentración espermática. La concentración espermática se determinó mediante el método espectrofotométrico usando un Spermacue Minitube[®]. La viabilidad espermática, asumida como la integridad de la membrana, se determinó por el conteo de espermatozoides cuya coloración se tornó diferente frente a la tinción con eosina-nigrosina. La motilidad se determinó mediante el análisis visual de una alícuota de 8 microlitros (μL) bajo un microscopio óptico con objetivo de 40x, teniendo en cuenta sólo los espermatozoides con movimiento progresivo en varios campos ópticos. La colección de las muestras de semen así como la medición de calidad seminal se realizaron en las instalaciones del Centro de Reproducción Integral Animal CRIA. Todas las características de calidad seminal se registraron en formatos de control establecidos por el CRIA (Anexo 1)

Obtención del plasma seminal y cuantificación de proteína

El plasma seminal se obtuvo por centrifugación del semen a 10000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y el nuevo sobrenadante obtenido se filtró mediante una membrana Millipore 6V de 0,22 μm . Al filtrado se le adicionó fenilmetilsulfonil fluoruro 5 μM como agente inhibidor de proteasas y se guardó a -20°C hasta su uso. Posteriormente se realizó una cuantificación de proteínas a cada muestra de plasma seminal mediante métodos espectrofotométricos a través de un miniespectrofotómetro *nanodrop* (Anexo 2), usando el coeficiente de absortividad molar (ϵ) de la albúmina sérica bovina BSA (0,667 para el equipo específico)

Electroforesis SDS 2D

La separación de las proteínas por su punto isoelectrónico (primera dimensión) se llevó a cabo mediante una cámara de isoelectroenfoque *IEF protean* de *Bio Rad* y con el uso de tiras de poliacrilamida con gradiente de pH inmovilizado (IPGs) con 8 cm de largo y en rangos de pH de 3 a 10 y de 4 a 7. Las tiras se hidrataron de forma pasiva (toda la noche) usando un buffer con anfolitos para lograr el punto isoelectrónico, y tributilfosfina (TBP). En cada tira se usaron 100 microgramos de proteína total (Anexo 3).

La segunda separación (o segunda dimensión) se realizó con base al peso molecular de cada proteína. Esta se hizo en minigeles denaturantes de 10 cm de ancho, 8 cm de alto y 1 mm de espesor, con un gradiente de poliacrilamida de 10% a 20% preparado a partir de un patrón de 30% (acrilamida:bisacrilamida 29:1). El gradiente de poliacrilamida se realizó por gravedad mediante un formador de gradiente con vasos comunicantes internos de *Bio Rad*. Además de la acrilamida, los geles se prepararon usando N,N,N,N Tetrametil-etilendiamina (TEMED), Persulfato de amonio (APS) 1% y Buffer Lower pH 8.8 con

dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% y Acido etilenditraminoacético (EDTA) 0,5 M. Los geles se dejaron en reposo durante 15 minutos hasta que alcanzaron la polimerización completa. Se uso isopropanol con el fin de crear dos fases lo que posteriormente facilitó la colocación de las tiras de isoelectroenfoque. Las tiras se fijaron a los geles mediante una solución agarosa 1% con azul de bromofenol a 2% y la separación por peso molecular se hizo en una cámara de electroforesis vertical *Miniprotean cell* de *Bio Rad* a 85 voltios durante 180 minutos. Se usó un marcador de peso para electroforesis bidimensional con 7 proteínas de referencia de pesos moleculares entre 6 y 80 kDa, y puntos isoeléctricos entre 3 y 10.

Se obtuvo un total de 60 geles, 30 de plasma seminal de cada raza. Los geles obtenidos se digitalizaron en un documentador Gel Doc XR *Bio Rad* y las imágenes resultantes se analizaron mediante el programa PD Quest de *Bio Rad*, programa que permitió la cuantificación relativa de cada uno de los puntos en el gel. Los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de cada punto en los mapas electroforéticos se obtuvieron usando geles con marcador de peso molecular para electroforesis bidimensional (Anexo 4).

Toros de referencia

Se seleccionó como referencia, un toro de cada raza con buena salud y desempeño reproductivo y cuyas características tanto de calidad seminal como de fertilidad fuesen fácilmente comprobables (Anexo 5). Se elaboraron tres geles de proteínas de muestras plasma seminal de cada toro referencia con un intervalo de 15 días entre cada muestreo. Las colectas se realizaron entre los meses de mayo y junio

Análisis estadístico

La correlación entre las cantidades relativas de cada punto de proteína (expresadas en porcentajes) y las variables de calidad seminal se determinó mediante una prueba de Pearson. Se compararon las cantidades relativas de proteínas y las variables de calidad seminal entre las dos razas evaluadas mediante una prueba de t. Las variables concentración espermática y motilidad espermática se transformaron usando el logaritmo de dichas variables (Urfer y Jung., 2006).

Resultados

Variables de calidad seminal

En este trabajo se midieron los parámetros convencionales de calidad seminal y los resultados se compararon mediante una prueba de t. Estos resultados evidenciaron diferencias significativas entre las muestras de semen de toros Sanmartinero y Cebú, en las variables de viabilidad espermática y concentración

espermática (tabla 1). El semen de toros Sanmartinero presentó un promedio de viabilidad espermática de $76,69 \pm 7,47\%$.

Tabla 1. Calidad seminal (viabilidad, motilidad y concentración espermática en semen de toros de las razas Sanmartinero y Cebú

Raza	% viabilidad	% motilidad masal	% motilidad individual	Concentración espermática (1×10^6 spz)
Sanmartinero	$76,69 \pm 7,47^*$	$75,61 \pm 14,05$	$76,34 \pm 11,97$	$1224,40 \pm 424,02^{**}$
Cebú	$64,08 \pm 17,15$	$69,88 \pm 19,83$	$73,60 \pm 15,43$	$692,20 \pm 206,33$

* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Se evidencian diferencias significativas $p < 0,05$ en la viabilidad espermática y $p < 0,001$ en la concentración espermática

Concentración de proteínas en plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú

La concentración promedio de proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú Sanmartinero fue $134,38 \pm 33,08$ mg/ml, y en Cebú fue $146,66 \pm 19,03$ mg/ml. Por su parte, el análisis realizado mediante el modelo de medidas repetidas evidenció tendencias estables en la raza Sanmartinero a través del tiempo. Mientras que en la raza Cebú, la tendencia que se observa a partir de los estimados del modelo (figura 8) es hacia un incremento gradual en la concentración de proteínas en cada muestreo.

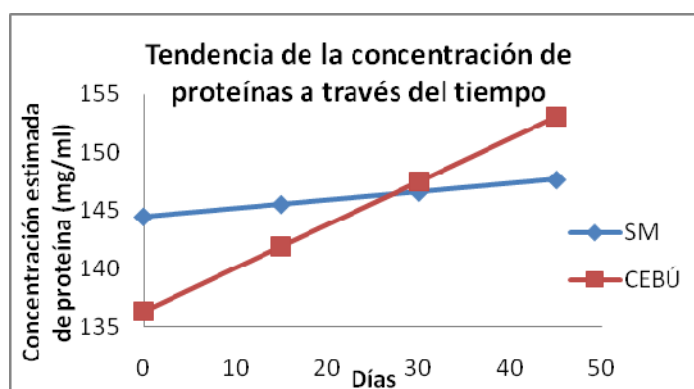


Figura 8. Tendencias de las concentraciones de proteína (mg/ml) en plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú a través del tiempo.

Proteínas del plasma seminal de los toros control

En el presente trabajo, el estudio de las proteínas del plasma seminal se inició con la separación electroforética, para lo cual se eligió un toro control de cada raza.

Las comparaciones y el análisis se realizaron teniendo como referencia geles bidimensionales obtenidos a partir de muestras seminales de los toros control. El toro control Sanmartinero presentó un total de 79 puntos de proteína, mientras el plasma seminal del toro control Cebú presentó 74 (figura 9).

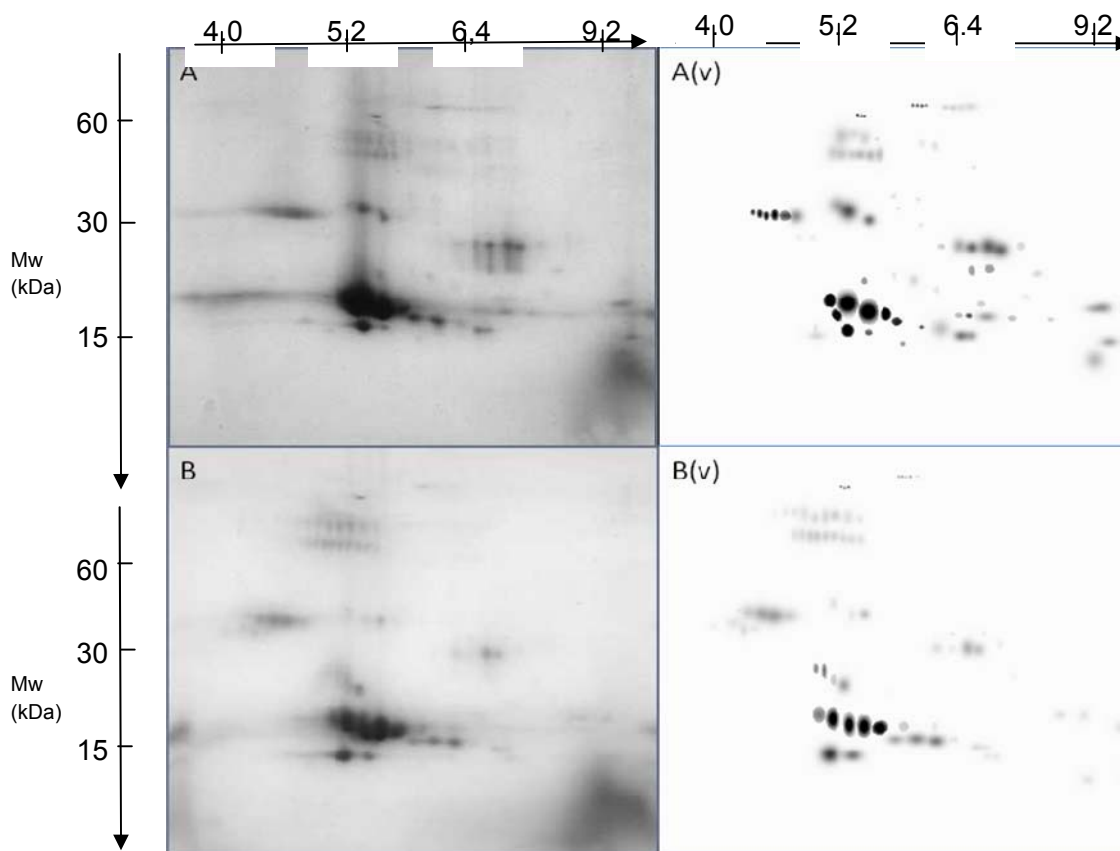


Figura 9. Mapas bidimensionales de proteínas de plasma seminal de los toros control. A. Mapa electroforético bidimensional de proteínas del plasma seminal de un toro Sanmartinero, A(v) Imagen Virtual generada mediante el programa de análisis de imágenes, B. Mapa electroforético bidimensional de proteínas del plasma seminal de un toro Cebú y B(v) Imagen Virtual generada mediante el programa de análisis de imágenes

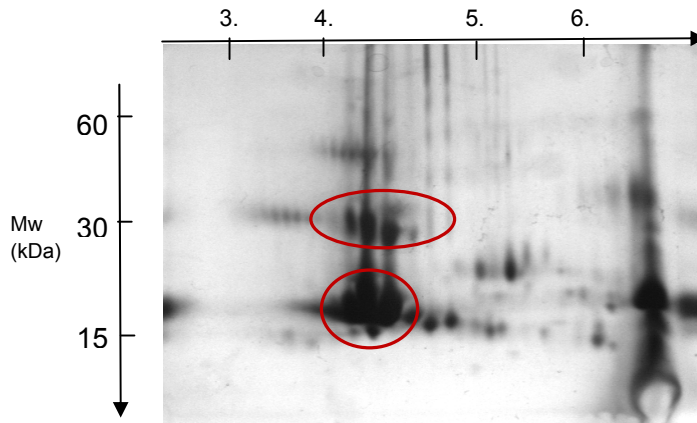


Figura 10. Gel bidimensional con carga excesiva de proteína. Los grupos de proteínas señalados con un círculo, con peso molecular entre 14 y 30 kDa presentan gran dificultad en el análisis por la baja resolución de los puntos.

La cantidad de proteína empleada para la electroforesis se mantuvo constante para todas las muestras (100 μg de proteína por cada gel). La cantidad adicionada fue adecuada para que los puntos de proteína de más bajo peso molecular (entre 12 y 16 kDa) presentaran la mejor resolución para el análisis, dado que las proteínas que aparecen en éste rango de pesos moleculares son las más abundantes. Esto genera dificultades en lo que se refiere al análisis mediante el programa (Figura 10).

Teniendo en cuenta la ubicación de los puntos, y comparándolos con trabajos anteriores, es posible que el grupo de puntos señalado con el círculo sean proteínas BSP A1, A2 y A3, y el grupo señalado con el rectángulo sean proteínas BSP de 30 kDa (figura 11). Al comparar los pesos moleculares y pls teóricos reportados en las bases de datos, con los experimentales evidenciados en éste y en otros trabajos (Moura, 2006), es posible que los puntos mencionados anteriormente sean proteínas BSP (tabla 2). Sin embargo, la única forma de tener seguridad en cuanto a la identidad de estas proteínas es a través de la determinación de la secuencia de aminoácidos mediante el uso de técnicas analíticas de alta precisión, como espectrometría de masas (MS) o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

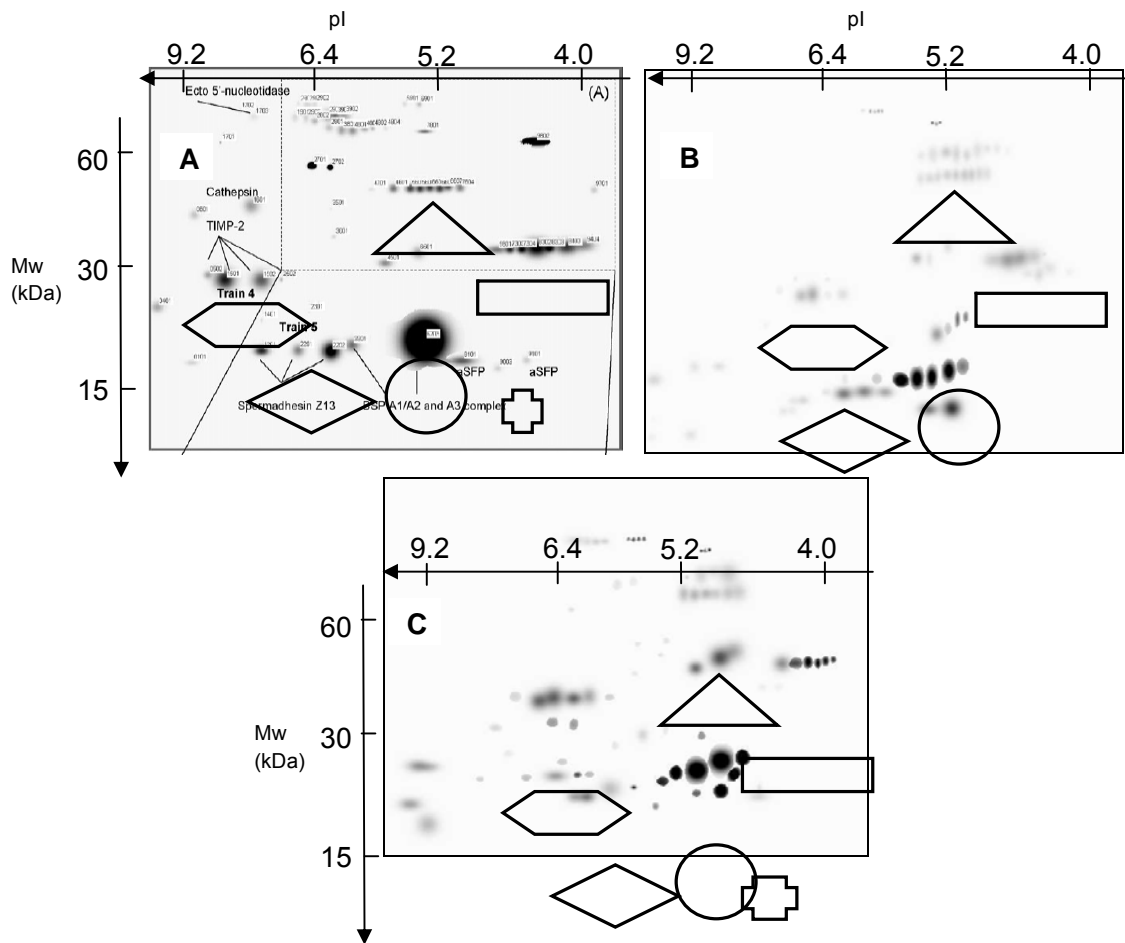


Figura 11. Semejanzas entre geles bidimensionales virtuales generados a partir de PD Quest de: A. Proteínas de fluido de las glándulas accesorias (Tomado de Moura 2007), B. Proteínas de plasma seminal de toros Cebú y C. Proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero. Los círculos representan el grupo caracterizado como BSP A1, A2 y A3, los rectángulos muestran las denominadas BSP 30 kDa, los triángulos muestran el grupo de clusterinas, los rombos señalan grupos de Espermadhesinas Z13 y los hexágonos muestran el inhibidor de metaloproteínasa TIMP-2. Las cruces de la parte inferior derecha representan las aSFP presente solo en A y C.

Tabla 2. Comparación de pesos moleculares (MW) y puntos isoeléctricos (pI) de los puntos determinados en este trabajo con los MW y pI reportados en otras investigaciones para proteínas BSP

Proteína	Puntos (Id)	Teórico ^a	Mw/pI	
			Experimental ^b	Experimental 2 ^c
BSP A1/A2	2102, 2202, 3202, 3203, 4104	15.6/5.1	16.2-16.8/5.1-5.5	14.0/5.7
BSP A3	2202, 3101	13.0/5,1	13.2/5.1-5.2	14.0/6.2
BSP 30 kDa	1402, 1403, 1405, 1406, 1407	22.0/5.7	28.7 /4.1-4.4	28.0/4.8-5.1

a) Teóricos (reportados por la base de datos NCBI Prot para las proteínas BSP A1/A2 y 30 kDa), b) Obtenidos en la presente investigación (probablemente proteínas BSP) y c) Caracterizados como proteínas BSP en plasma seminal y fluido de las glándulas accesorias por Moura en el 2007.

De otra parte, y según la posición de los puntos en los mapas electroforéticos, las proteínas señaladas con un triángulo (figura 11) probablemente representen el grupo de clusterinas en sus isoformas de 40 kDa (tabla 3).

Tabla 3. comparación de pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los puntos determinados en este trabajo con los pesos moleculares y puntos isoeléctricos reportados en otras investigaciones para proteínas clusterina

Proteína	puntos	Mw/pI			
		Teórico ^a	Experimental (1) ^b	Experimental (2) ^c	Experimental (3) ^d
Clusterina	2602, 3605, 3606	52.0/5,4	45/5.0-5.2	38-40/3.6-6.0	40/5.4-6.1

a) teóricos (reportados por la base de datos NCBI Prot para la clusterina), b) Obtenidos en la presente investigación (que probablemente sean clusterinas), c) Caracterizados como clusterinas en plasma seminal y fluido de las glándulas accesorias por Moura en el 2007 y D) Caracterizados como clusterinas por Ibrahim en 1999

Con respecto a los puntos de proteína señalados con un rombo (figura 11), es probable que correspondan a puntos de espermadhesina Z13. Se cree que el grupo de puntos de espermadhesinas son subunidades de la misma. Se ha determinado que ésta proteína proviene de las glándulas sexuales accesorias y se relaciona con la motilidad espermática (Moura., 2007). Los tres puntos evidenciados en ésta parte de los geles tienen peso molecular de 14.1 kDa y puntos isoeléctricos comprendidos entre 6.0 y 6.3, similar a lo encontrado en diferentes experimentos (tabla 4). Estos puntos representaron en cantidad cerca del 6 % promedio de las proteínas totales del plasma seminal.

Tabla 4. Comparación de MW y pI de los puntos determinados en este trabajo con los MW y pI reportados en otras investigaciones para proteínas Espermadhesinas Z 13

Proteína	puntos	Mw/pI			
		Teórico ^a	Experimental (1) ^b	Experimental (2) ^c	Experimental (3) ^d
Esp. Z13	4102, 4105, 5102	14.0/6.3-6.8	14.1/6.0-6.3	13.0/6.3-6.8	16/6.7

a) Teóricos (reportados por la base de datos NCBI Prot NR para espermadhesina z13), b) Obtenidos en la presente investigación (probablemente espermadhesina z13), c) Caracterizados como espermadhesina z13 en plasma seminal y fluido de las glándulas

accesorias por Moura en el 2007 y D) Caracterizados como espermadhesina z13 por Killian en 1993

El grupo de puntos que aparece en los geles, señalado con la figura hexagonal (figura 11), por su ubicación y distribución a través de los geles, parece tratarse de la proteína inhibidora tisular de metaloproteinasa TIMP-2 y representó cerca del 7 % en promedio de las proteínas totales del plasma seminal analizado en la presente investigación. Existen semejanzas en cuanto a la ubicación de los puntos y los pesos moleculares pero ciertas diferencias en cuanto a los puntos isoeléctricos teóricos, reportados en las bases de datos, y experimentales obtenidos en otras investigaciones (tabla 5). Aunque la evidencia experimental muestra patrones muy cercanos, es de aclarar que la única forma de asegurar que se trata de estas proteínas es recurriendo a métodos precisos de análisis bioquímico como secuenciación por espectrometría de masas.

Tabla 5. Comparación de MW y pI de los puntos determinados en este trabajo con los MW y pI reportados en otras investigaciones para Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa TIMP-2

Proteína	Puntos	Mw/pI		
		Teórico ^a	Experimental (1) ^b	Experimental (2) ^c
TIMP-2	5402, 6402, 7406, 7407	25.0/7.5	25.4/6.1-6.9	25.0-26.0/6.7-7.2

a Teóricos (reportados por la base de datos NCBI NR Prot para el inhibidor tisular de metaloproteinasa TIMP-2), b) Obtenidos en la presente investigación (que probablemente sean TIMP-2) y c) Caracterizados como TIMP-2 por Moura en el 2007)

De otra parte, consecuente con la identificación de los puntos obtenidos, están dos puntos de proteína identificados con una cruz (figura 11 A y C). La identificación por punto isoeléctrico, peso molecular y posición general en el gel permite asociar estos puntos con las Proteínas ácidas del Fluido Seminal (aSFP, tabla 6). De las aSFP se ha establecido que participan en el mecanismo de protección del espermatozoide, inhibiendo el estrés oxidativo.

Tabla 6. Comparación de MW y pI de los puntos determinados en este trabajo con los MW y pI reportados en otras investigaciones para proteínas ácidas del plasma seminal Asfp

Proteína	Puntos	Mw/pI		
		Teórico ^a	Experimental (1) ^b	Experimental (2) ^c
aSFP	1001, 1002	13.0/5.0	10.3-12.0/4.3-4.5	13.0/4.3-5.0

a) Teóricos (reportados por la base de datos NCBI NR Prot para las proteínas ácidas del fluido seminal aSFP), b) Obtenidos en la presente investigación (que probablemente sean aSFP) y c) Caracterizados como proteínas aSFP en plasma seminal y fluido de las glándulas accesorias por Moura en el 2007

Dado lo anterior, es posible que la presencia de proteínas aSFP, que dan cierta protección a las células espermáticas, se relacione con la viabilidad espermática y el potencial fecundante del semen bovino.

Perfiles electroforéticos de proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú (grupo experimental)

En la primera parte de esta investigación los resultados evidenciaron que el semen de toros Sanmartinero presenta mayor viabilidad y concentración espermática comparado con el semen de toros Cebú. Estos parámetros, aunque no predicen eficientemente la fertilidad de un toro, establecen marcos de referencia para la selección de reproductores y para el proceso de criopreservación de material seminal. Aunque existe evidencia de las diferencias en éstos parámetros, no se conocen aun las razones exactas por las cuales se presentan.

Los mapas electroforéticos de las proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú presentan semejanzas en cuanto a la ubicación de muchos de los puntos (figura 12). Los mapas electroforéticos virtuales, (geles master) generados a partir del análisis de 27 muestras de toros Sanmartinero, evidenciaron la presencia de 75 puntos con un rango de pls entre 3,6 y 9,8 y un rango de pesos moleculares (Mw) entre 9,2 y 78,5 Kilodaltons (kDa). El análisis con el programa PD Quest demostró que el 85.3 % de los puntos encontrados en el mapa de plasma seminal de toros Sanmartinero tienen pH ácido.

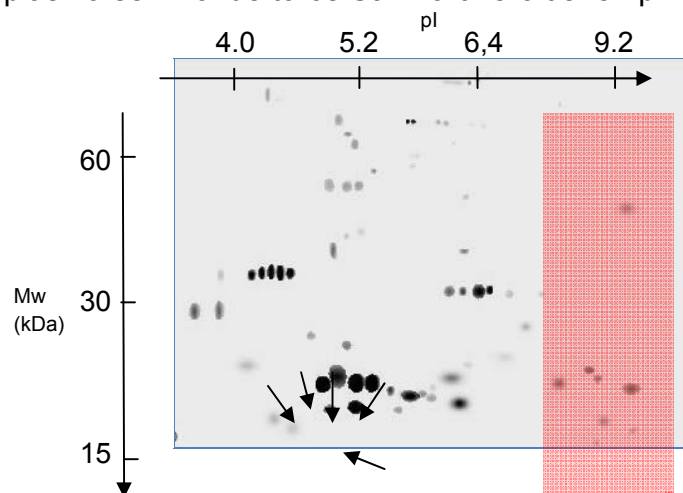


Figura 12. Mapa electroforético del plasma seminal del toros Sanmartinero (virtual) generado por el programa de análisis de imágenes PD Quest de Bio Rad®. La sección roja corresponde a la parte del gel que contiene las proteínas con pH básico. Las flechas señalan los puntos de proteínas con la mayor concentración relativa.

Por su parte, el análisis de los geles de plasma seminal de toros Cebú generó un gel master con un total de 67 puntos de proteína, ubicados en un rango de pls comprendido entre 3,95 y 9,8; y un rango de pesos moleculares entre 12.3 y 76.0 kDa. De éstos 67 puntos, 51 tienen pH ácido (76 %) Figura 13.

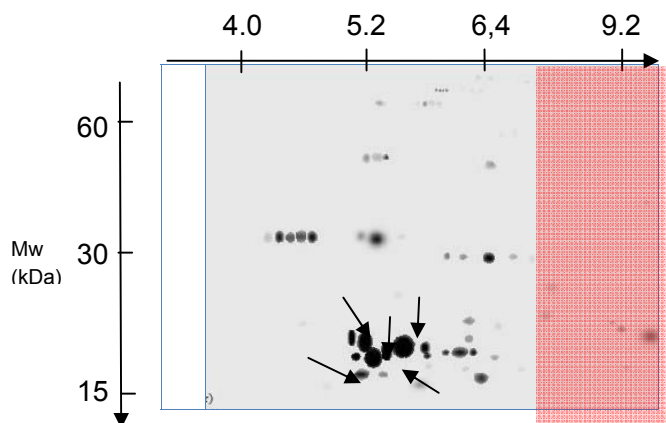


Figura 13. Mapa electroforético del plasma seminal del toros Sanmartinero (virtual) generado por el programa de análisis de imágenes PD Quest de Bio Rad®. La sección roja corresponde a la parte del gel que contiene las proteínas con pH básico. Las flechas señalan los puntos de proteínas con la mayor concentración relativa.

En cuanto a los puntos de proteínas descritos en el apartado anterior, las cantidades relativas expresadas en porcentaje de la proteína total, se puede apreciar que en todos los grupos la cantidad relativa de estas proteínas es mayor en plasma seminal de toros Sanmartinero, diferencia que solo es significativa ($p < 0.05$) en el grupo de puntos que probablemente correspondan a proteínas BSP de 30 kDa (figura 14).

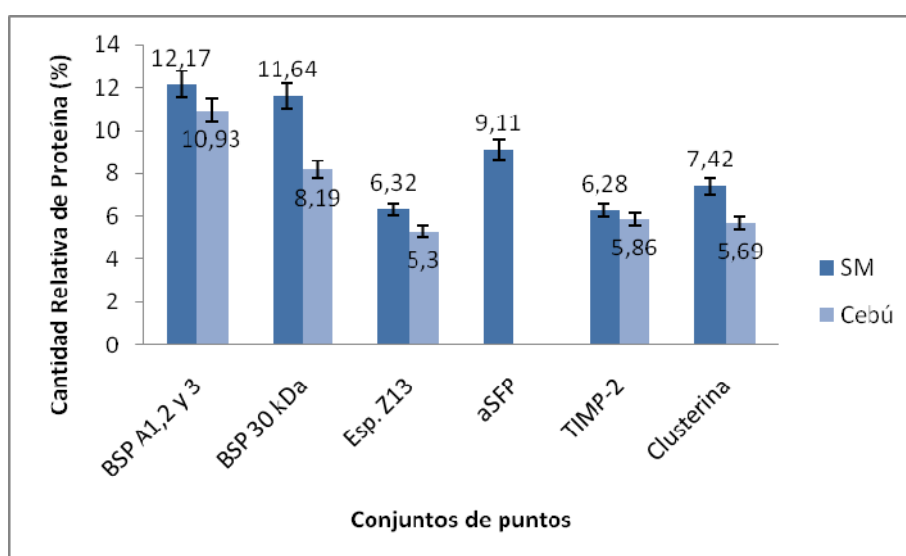


Figura 14. Diferencias de cantidad relativa en porcentaje en grupos de puntos entre mapas electroforéticos de plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú.

En lo que respecta a los puntos que probablemente correspondan a isoformas de clusterina (Mw 45.0 y pl 5.0-5.2), se detectaron concentraciones relativas mayores ($p < 0,05$) en el plasma seminal de toros Sanmartinero.

De otra parte, se encontraron 11 puntos de proteína en el mapa electroforético del plasma seminal de toros Sanmartinero, los cuales no se detectaron en plasma seminal de toros Cebú (figura 15). Estos comprenden pesos moleculares entre 9,2 y 71,18 kDa, 3 de los cuales presentan pl mayor a 7. El punto "1001" con peso molecular de 12 kDa y pl de 4,3 (figura 16) es el punto exclusivo de plasma de Sanmartinero que se presenta con mayor frecuencia en las muestras analizadas (tabla 7).

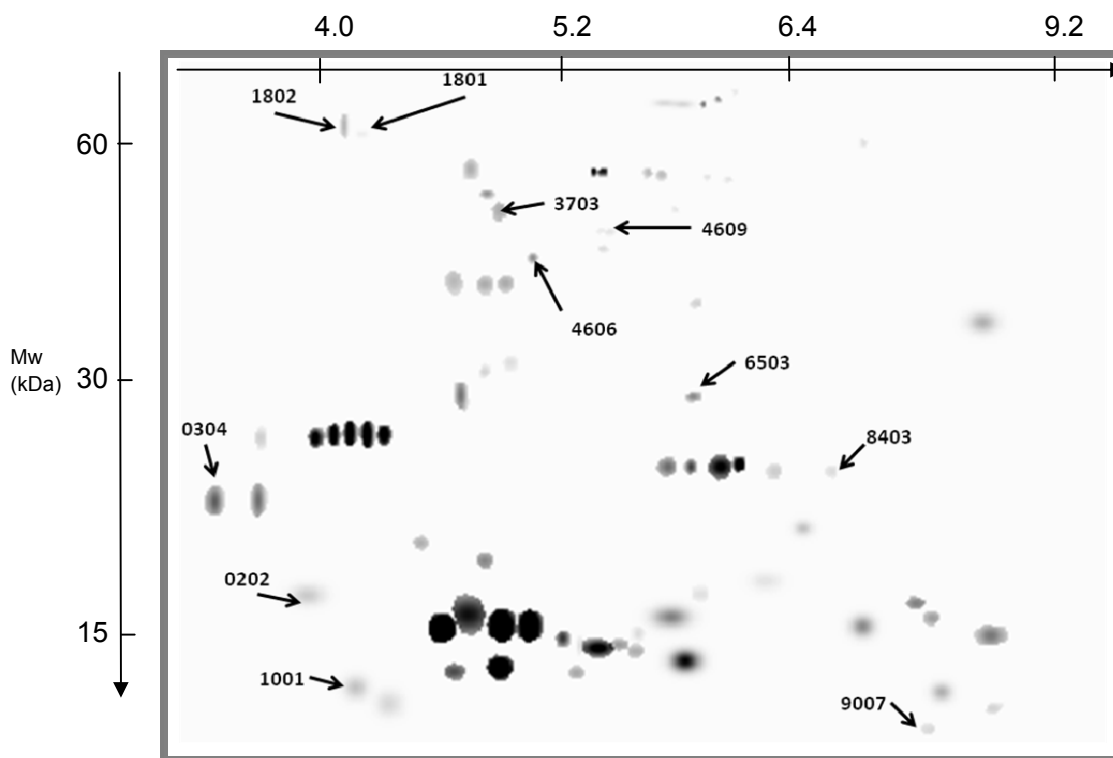


Figura 15. Mapa electroforético de plasma seminal de toros Sanmartinero.. Los puntos señalados se presentaron exclusivamente en toros de ésta raza.

Tabla 7. Pesos moleculares y puntos isoelectricos de los puntos de proteína exclusivos de la raza Sanmartinero. Se señalan los puntos que aparecen con mayor frecuencia.

Punto de proteína	Peso molecular (kDa)	Punto isoelectrico (pH)	n
1801	69,37	4,2	7
1802	71,18	4,04	7
0304	23,22	3,60	5
0202	18,22	3,82	6
1001	12,00	4,30	11
3703	55,34	5,17	9
4606	48,17	5,34	7
4609	52,25	5,68	5
6503	32,06	6,11	5
8403	25,06	7,69	7
9007	9,2	8,99	10

En lo que respecta al mapa electroforético del plasma seminal de los toros Cebú, existen 15 puntos que solo aparecen en muestras de ésta raza (figura 20). Estos puntos tienen un rango de pI entre 4,83 y 9,8 con pesos moleculares entre 12,46 y 73,55 kDa.

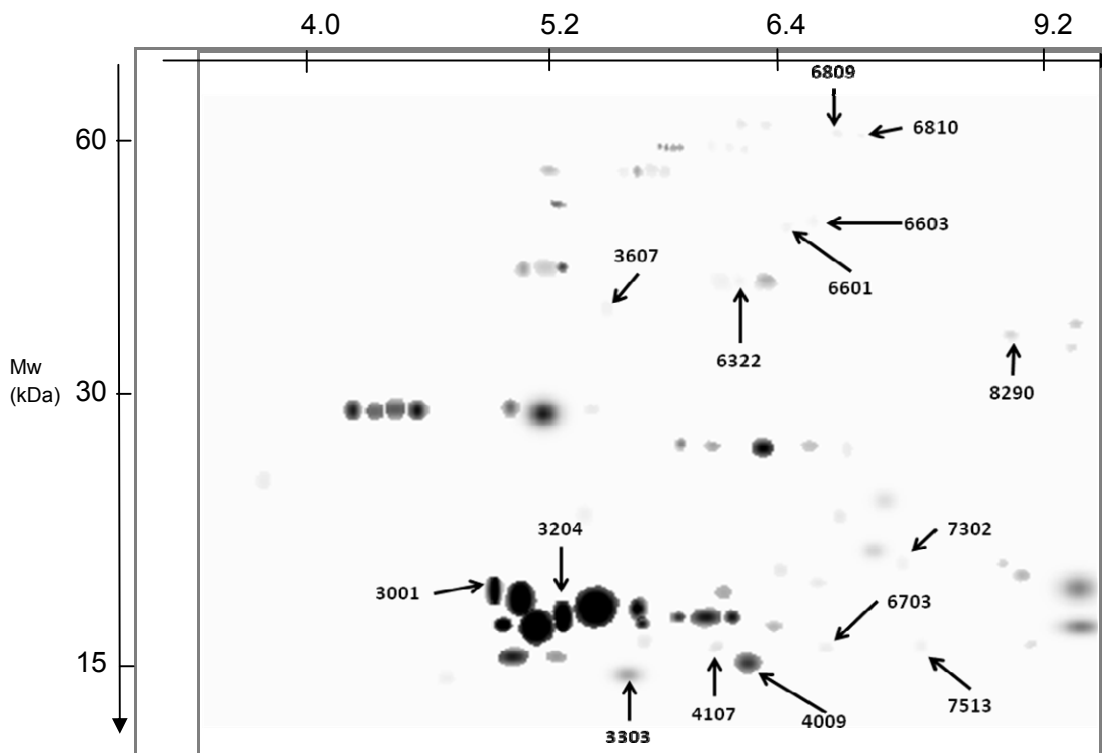


Figura 16. Mapa electroforético de plasma seminal de toros Cebú. Los puntos señalados solamente se presentaron en toros de ésta raza.

Dos de los puntos (“3001” y “3004”) aparecen en todos los muestreos de los toros cebú analizados, en tanto que el punto “3303” aparece en 22 de las muestras analizadas. Siete de estos puntos (6603, 6703, 7302, 7513, 6809, 6810 y 8290) tienen pH superior a 7 (tabla 8). Dos de estos puntos (3001 y 3204) presentaron pI y M_w cercanos y similares a los reportados para las proteínas BSP. Según el mapa electroforético, la ubicación de estos puntos en el grupo de las BSP podrían sugerir que se trata de alguna isoforma que se expresa en toros de la raza cebú.

Tabla 8. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los puntos de proteína exclusivos de la raza Cebú. Se señalan los puntos que se presentaron con mayor frecuencia

Punto de proteína	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pH)	n
3001	16,41	4,83	26
3204	15,52	5,44	26
3607	46,80	5,23	8
3303	12,46	5,62	22
4107	13,65	6,15	12
4009	12,95	6,37	6
6322	44,71	6,56	8
6601	53,62	6,77	12
6603	54,60	7,04	10
6703	13,60	7,17	14
7302	18,53	7,67	8
7513	15,70	8,16	6
6809	73,55	7,29	8
6810	73,55	7,53	8
8290	37,19	9,09	7

Después de analizar las imágenes de los geles y determinar los puntos exclusivos de cada raza, se compararon las cantidades relativas de los puntos que coincidieron en los mapas electroforéticos de ambas razas. La cantidad relativa de cada punto se determinó a partir de la densidad óptica obtenida mediante el programa de análisis de imágenes, después de la digitalización de los geles de poliacrilamida.

De los puntos comparados, diez presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (Figura 17), cinco con mayor cantidad en toros Sanmartinero y cinco con mayor cantidad en toros Cebú (tabla 9). Las cantidades relativas de los puntos identificados como 3203, 3606, 3503, 4102 y 8301 mostraron concentraciones relativas superiores en plasma seminal de toros Sanmartinero, mientras los puntos 1402, 2202, 4002, 6806 y 9002, presentaron mayores cantidades relativas en plasma seminal de toros Cebú.

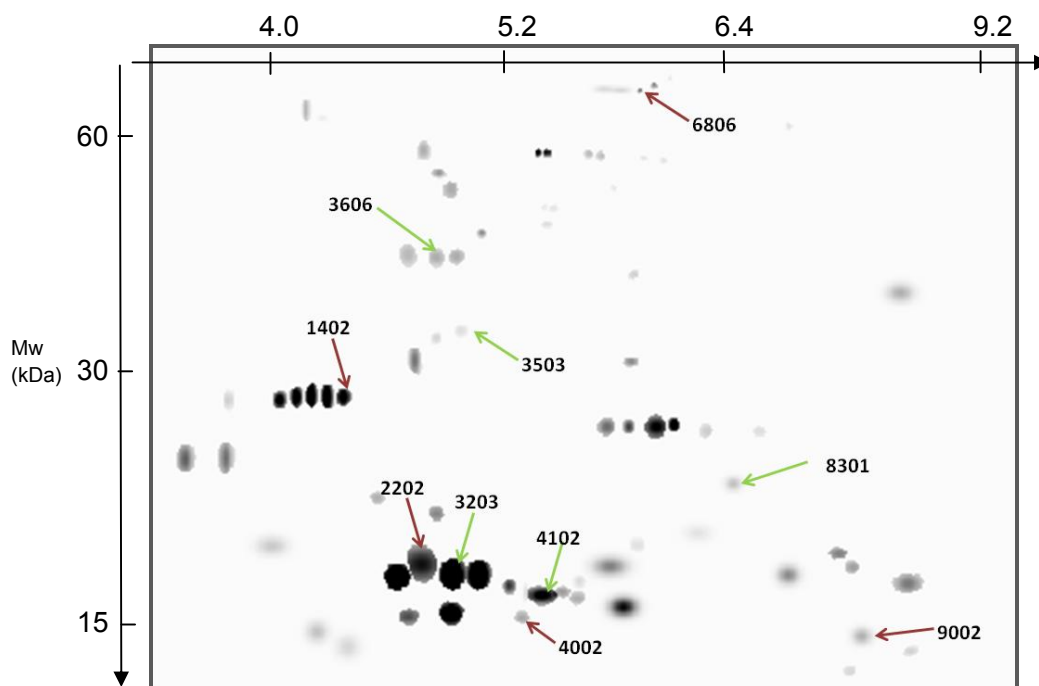


Figura 17. Diferencias significativas ($p < 0.05$) en cantidades relativas de proteínas de plasma seminal de Sanmartinero y Cebú. Las flechas verdes indican los puntos de proteína que tienen mayor cantidad en Sanmartinero y las rojas señalan los puntos con mayor cantidad en plasma de Cebú. Los números que aparecen en la imagen son asignados aleatoriamente por el programa de análisis de imágenes PD quest.

Tabla 9. Puntos de proteína que presentaron diferencia significativa ($p \leq 0,05$) cuando se compararon las cantidades relativas de cada punto en las razas Sanmartinero (SM) y Cebú.

Cantidad relativa (%) de los puntos de proteínas (Mw/pI)					
raza	1402 (28,76/4,37)	2202 (17,4/5,01)	3203 (16,89/5,32)	3606 (44,55/5,10)	3503 (35,41/5,23)
SM	1,72 ± 0,66	1,2 ± 0,42	2,45 ± 0,54	4,45 ± 2,01	4,85 ± 1,82
Cebú	2,37 ± 0,49	0,73	1,45 ± 0,47	2,64 ± 0,87	1,60 ± 0,56

Cantidad relativa (%) de los puntos de proteínas (Mw/pI)					
raza	4002 (13,10/5,56)	4102 (15,26/5,67)	6806 (75,53/6,15)	8301 (21,66/7,33)	9002 (10,55/9,8)
SM	2,76 ± 0,80	3,38 ± 1,55	3,54 ± 0,64	3,89 ± 1,68	3,37 ± 1,24
Cebú	5,50 ± 2,23	0,64	4,99 ± 1,83	2,61 ± 0,66	5,36 ± 1,39

El punto "4102" (peso molecular 15,26 y punto Isoeléctrico 5,67) presentó mayor cantidad en el plasma seminal de toros de raza Sanmartinero.

Relación entre las proteínas del plasma seminal y la calidad seminal.

Para determinar la relación que existe entre la concentración de cada punto de proteína y las variables de calidad seminal (viabilidad, motilidad, concentración), se realizó una prueba de correlación de pearson en cada una de las razas analizadas. Los resultados muestran que, en el caso de la viabilidad espermática existe un punto de proteína (4104) que presenta correlación positiva con la viabilidad ($r=0,64$ $p<0,001$) en la raza Sanmartinero con peso molecular de 16,2 kDa y pI 5,5 (figura 18). En el caso de la raza Cebú, el punto de proteína 6701, con peso molecular de 69,9 kDa y pI 6,3, evidenció una correlación positiva ($r=0,56$ $p<0,05$) con la viabilidad (figura 19).

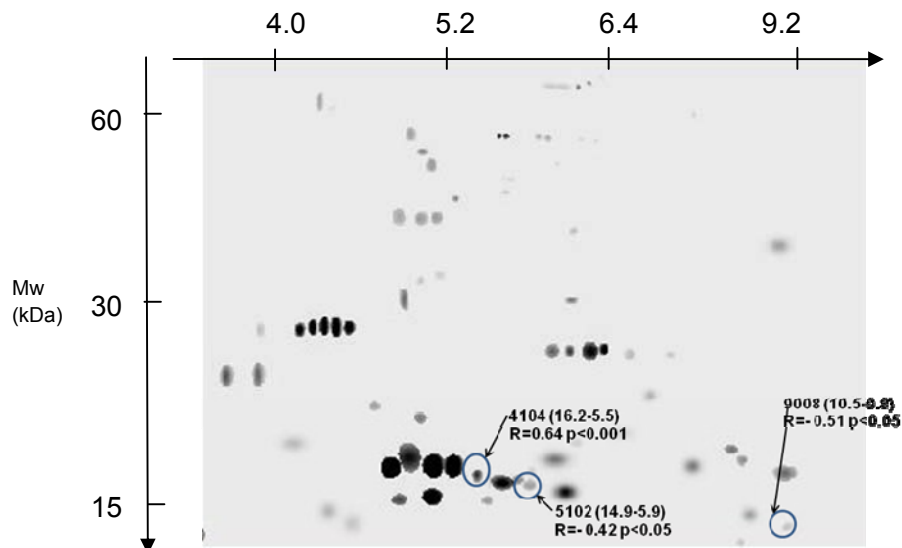


Figura 18. Mapa electroforético de proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero. Se señalan los puntos que presentaron correlación estadística con la viabilidad espermática.

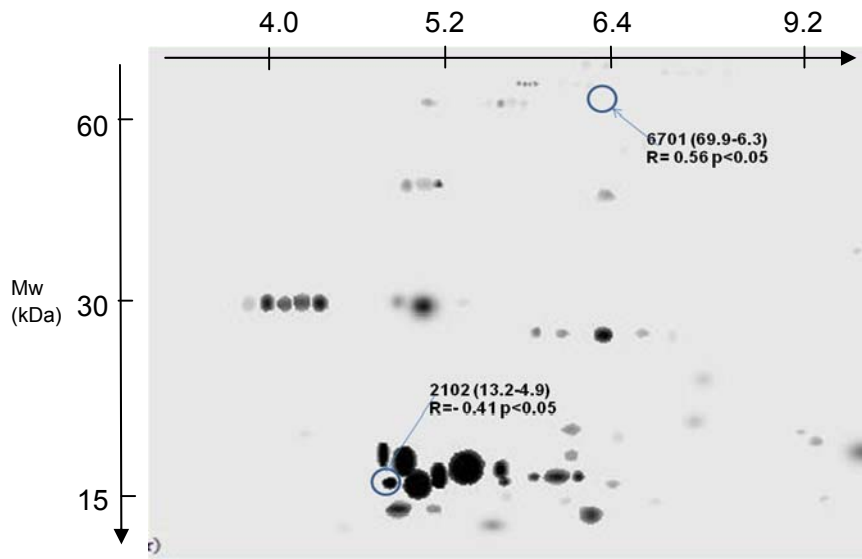


Figura 19. Mapa electroforético de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Se señalan los puntos que presentaron correlación estadística con la viabilidad espermática. Se presentaron otras correlaciones con viabilidad con un coeficiente menor y también entre puntos de proteínas y motilidad espermática (Tablas 10 y 11). Así mismo, se determinó que hay correlaciones entre puntos de proteína de diferentes pesos moleculares.

Tabla 10. Coeficientes de correlación entre puntos de proteína y parámetros de calidad seminal en plasma de toros Sanmartinero.

Punto de proteína (MW y pI)	Coeficientes de correlación (r)		
	Viabilidad (%)	Motilidad (%)	Con. espermática
0304 (23,22-3,59)			0,91*
2202 (17,40-5,01)		0,42*	
2602 (45,01-4,94)			0,66*
3101 (13,52-5,17)		0,40*	0,48*
3605 (44,70-5,20)		-0,58*	
4104 (16,20-5,49)	0,63**		
5102 (14,93-5,86)	-0,42*		
5802 (76,0-6,00)			0,58*
6101 (14,08-6,08)			0,49*
6503 (32,06-6,11)		0,96*	
6504 (42,20-6,13)		-0,85*	-0,94*
6801 (75,60-6,07)		0,52*	
7702 (60,66-6,33)			0,87**
9202 (17,24-9,02)		0,53*	0,58*
9008 (10,55-9,80)	-0,51*		

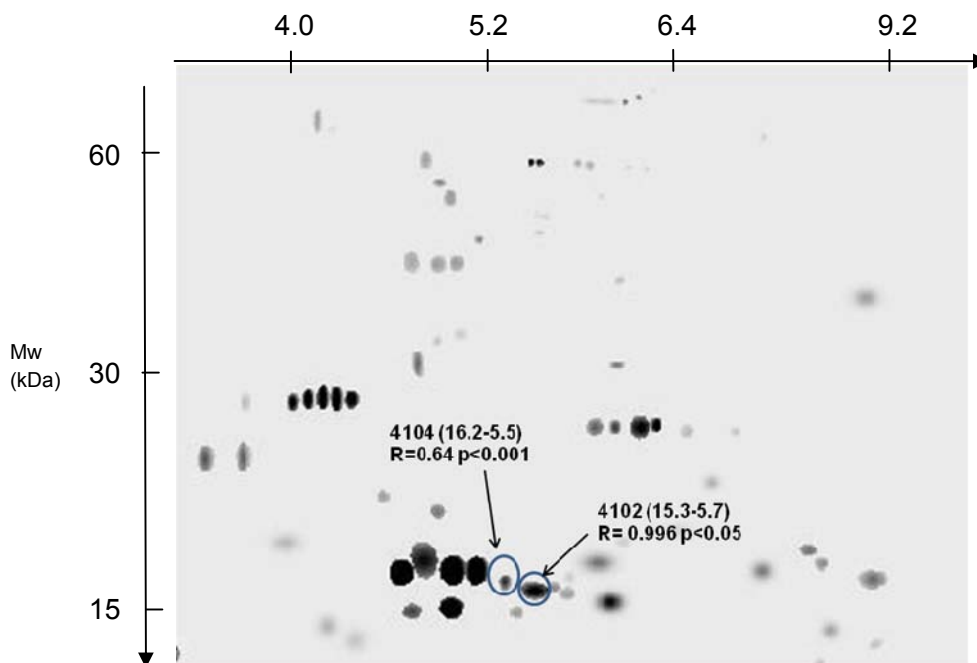
* $p < 0.05$ ** $p < 0.001$

Tabla 11. Coeficientes de correlación entre puntos de proteína y parámetros de calidad seminal en plasma de toros Cebú

Punto de proteína (MW y pI)	Coeficientes de correlación (r)		
	Viabilidad (%)	Motilidad (%)	Con. espermática
1201 (12,34-4,53)		0.98**	
1505 (28,70-4,08)	0.41*		
2102 (13,23-4,94)	-0.41*		
3501 (28,50-5,12)			0.50*
3502 (28,90-5,41)		0.87*	
4102 (13,89-5,73)		-0.64*	
4201 (14,75-5,71)			-0.76*
5202 (15,04-6,09)		0.45*	
6204 (14,59-6,64)		0.68*	
6701 (69,91-6,34)	0.56*		
7501 (24,77-7,01)		0.62*	

* $p < 0.05$ ** $p < 0.001$

De otra parte, las cantidades relativas de dos puntos de proteínas identificados como 4104 y 4102 (figura 20), con puntos isoeléctricos de 5.5 y 5.7 y pesos moleculares de 16.2 y 15.3, presentaron en el plasma seminal de toros de raza Sanmartinero, una correlación alta ($0.996 p < 0.05$) entre ellos. El punto 4104 coincide con las características de las proteínas BSP, es probable que éste punto corresponda a una isoforma de PDC 109, y por su parte el punto 4102 por sus características puede corresponder a la espermadhesina Z13.

**Figura 20.** Mapa electroforético virtual de proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero. Se señalan los puntos que presentaron correlación estadística entre sí.

Discusión

Calidad seminal

La medición de las variables convencionales de calidad seminal, se constituyen como una valoración inicial importante en procesos de criopreservación de semen para inseminación artificial. En éste trabajo, el semen de toros Sanmartinero presentó promedios de viabilidad espermática y concentración espermática cuando se compararon con la calidad seminal de los toros de raza Cebú. En el 2008, se reportaron promedios de viabilidad espermática de $88,8 \pm 3,32\%$ en semen de Toros Sanmartinero (Rueda y Cardozo, 2008), semejantes a los encontrados en el presente trabajo y tal investigación evidenció además que la viabilidad de semen de toros Sanmartinero es mayor a la presentada por toros de otras razas criollas como Costeño con Cuernos y Romosinuano.

De igual manera, en trabajos anteriores se han reportado promedios de motilidad espermática y concentración espermática de $78 \pm 12,4\%$ y $1.098 \pm 398,1 \times 10^6$ spz respectivamente, resultados similares a los encontrados en éste trabajo (Rueda, 2007; Barajas, 2009).

En los últimos años, la prueba de fertilización *in vitro* se ha ratificado como una de las que mejor ayuda a predecir la fertilidad del semen bovino. Esta prueba se relaciona en gran medida con la integridad de la membrana del espermatozoide y por consiguiente con los porcentajes de viabilidad espermática en una muestra seminal. En el 2000, Alza y Jiménez lograron evidenciar mayores porcentajes de oocitos penetrados *in vitro* Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú comparación con los porcentajes obtenidos por espermatozoides de raza Cebu ($49,6\%$ vs $38,9\%$ respectivamente, $p < 0,05$). Lo anterior evidencia una marcada diferencia en cuanto a calidad seminal, diferencia que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación y sugiere una mayor fertilidad de los toros de ésta raza con respecto a toros Cebú.

Concentración de proteínas en plasma seminal

En cuanto a la concentración de proteínas totales de plasma seminal de los toros Sanmartinero y Cebú no hubo diferencias significativas. Sin embargo, las concentraciones encontradas fueron más altas en comparación con otros trabajos. En el 2006, Mosheta encontró una concentración promedio de proteínas en plasma seminal de 55 toros Cebú Nelore de $21,36$ mg/ml con variaciones entre $2,63$ y $69,44$ mg/ml, concentraciones significativamente menores a las encontradas en este trabajo. De otro lado, mediante trabajos realizados en el programa de Fisiología y Nutrición Animal de CORPOICA, se logró determinar una concentración promedio de proteína en plasma seminal de 10 toros Sanmartinero de $71,40$ mg/ml (Rueda y Cardozo, 2007). Aunque las concentraciones de proteínas determinadas en otros trabajos son mucho menores a las presentadas en ésta investigación, las técnicas usadas son

diferentes en cuanto a sensibilidad. Las técnicas empleadas en los trabajos que involucran electroforesis para separar proteínas de plasma seminal, determinan la concentración de proteínas mediante métodos colorimétricos (Manjunath, 1993; Killian, 1993; Moura, 2006). En esta investigación, la determinación de la cantidad de proteína en plasma seminal se realizó de forma directa midiendo la absorbancia a 280 nm, lo cual explicaría las diferencias.

Proteínas del plasma seminal de los toros control

Cuando se analizaron los geles bidimensionales de plasma seminal de los toros control no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de puntos, cuando se usaron 100 ug de proteína en la carga inicial (79 y 74 puntos respectivamente). Diferente a este trabajo, en 1998 Mortarino y Tedeshi reportaron la presencia de cerca de 250 puntos de proteína en geles de plasma seminal de 30 toros Holstein, haciendo énfasis en dos tipos de proteínas especializadas y cuyas cantidades constituyen los mayores porcentajes de proteína en el plasma seminal: las proteínas PDC 109 y las proteínas ácidas de fluido seminal aSFP. En el trabajo de Mortarino se explica que aumentar la carga de proteína en más de tres veces por gel, incrementa sustancialmente la cantidad de puntos de proteína detectables por la técnica, especialmente de aquellos puntos cuya expresión es muy baja, pero disminuye la resolución en aquellos puntos de gran concentración e importancia como los que representan las PDC 109 y las aSFP.

En este sentido, Moura en el 2007 determinó el mapa electroforético de proteínas provenientes del fluido de las glándulas accesorias a partir de 37 toros Holstein que se alteraron quirúrgicamente por inserción de catéteres en los vasos deferentes, lo cual permitió la colección de fluido de las glándulas accesorias sin espermatozoides o secreciones del epidídimo. En dicho trabajo se detectó un promedio de 52 puntos de proteína mediante el programa de análisis de imágenes PD Quest[®]. Al comparar las imágenes de, los geles obtenidas en el presente trabajo, con las obtenidas en el trabajo Moura, se aprecian semejanzas importantes cuanto a la ubicación de muchos de los puntos de proteínas. Proteínas como BSP A1, A2, A3 y de 30 kDa, así como grupos de clusterina, espermadhesina Z13, proteínas ácidas del fluido seminal (aSFP) entre otras, se detectaron en los dos trabajos y se describen como algunos de los más importantes para la funcionalidad de la célula espermática.

Las proteínas BSP se relacionan ampliamente con la capacitación espermática y se sabe que su interacción con el colesterol y con los residuos de colina de fosfolípidos de membrana, media la apertura de canales iónicos que resultan en la capacitación espermática. Se ha reportado que representan entre el 40 y el 50 % de las proteínas totales del plasma seminal. En la presente investigación el grupo de posibles BSP está presente en todas las muestras de plasma seminal analizadas y representa entre el 25 y 35 % de las proteínas totales, de las cuales los puntos que posiblemente sean BSP A1 y A2 (también llamadas PDC 109)

representan entre el 15 y el 19 %. Estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que las cantidades de proteínas BSP, así como las de osteopontina, presentes en el fluido de las glándulas accesorias se relacionan con la fertilidad en el toro y en éste fluido representan cerca de 86% de las proteínas totales (Killian, 1993; Ibrahim, 1999).

Por su parte, se encontraron semejanzas en cuanto a la ubicación en los geles bidimensionales (Mw y pI), de puntos anteriormente caracterizados como Clusterina, Espermadhesina Z13, Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa TIMP-2 y proteínas ácidas del plasma seminal aSFP.

En éste sentido, se ha determinado que la clusterina es una proteína multifuncional con varios roles específicos. Reyes y Boilard en el 2002, determinaron que la clusterina, contrario a las BSP, hace parte del fluido epididimal, y encontraron ciertas cantidades en la célula espermática. La clusterina puede prevenir el daño causado por el estrés oxidativo en el espermatozoide y además parece estar involucrada en el proceso de espermatogénesis, en el cual previene la lisis celular y media la distribución de los lípidos a través de la membrana espermática. Ibrahim en 1999, logró determinar 3 isoformas de clusterina con un amplio rango de puntos isoeléctricos (entre 3,6 y 6) y pesos moleculares de 40, 39 y 38 kDa. Según lo anterior, en el plasma

Discusión los toros Sanmartinero y Cebú pueden estar presentes estas clusterinas, las cuales representan entre el 2.8 y 3.5% de las proteínas totales, con pesos moleculares de 45 kDa y puntos isoeléctrico entre 5.0 y 5.2, cercano a lo reportado por las bases de datos Internacionales y por experimentos en otras investigaciones.

Por su parte, los puntos que posiblemente correspondan a proteínas espermadhesinas Z13 y que se distribuyen en fila a través del gel bidimensional, pueden ser subunidades de la misma proteína. En 1993 Killian, logró determinar en plasma seminal de 35 toros Holstein, una proteína de 16.0 kDa y pI de 6.7, la cual se presentaba en mayor cantidad en toros de baja fertilidad. La fertilidad se determinó por el éxito o fracaso de la inseminación con 1000 dosis de pajillas congeladas, se estableció que la proteína de 16 kDa se presentaba en mayor cantidad y frecuencia en toros que presentaban porcentajes de éxito en inseminación más bajos (inferiores al 20%), reconociendo este punto de proteína como un factor "anti-fertilidad". Otros trabajos hablan de una relación entre la cantidad relativa de la proteína espermadhesina Z13 y la actividad mitocondrial del espermatozoide, indicando que superadas ciertas cantidades, inhibe la motilidad espermática *In vitro*. Sin embargo, el mecanismo detallado por el cual se puede explicar la influencia de la espermadhesina en la actividad mitocondrial aun requiere de más experimentación (Moura, 2007).

En cuanto a los puntos de proteína que coinciden con las características de las proteínas TIMP-2, existen semejanzas en cuanto la ubicación de los puntos y los pesos moleculares pero ciertas diferencias en cuanto a los puntos isoeléctricos

teóricos, reportados en las bases de datos, y experimentales obtenidos en otras investigaciones. Aunque la evidencia experimental muestra patrones muy cercanos, es de aclarar que la única forma de asegurar que se trata de éstas proteínas es recurriendo a métodos precisos de análisis bioquímico como secuenciación por espectrometría de masas.

Aunque las metaloproteinasas se relacionan estrechamente con la membrana del espermatozoide y la fusión de gametos, la TIMP-2 se encuentra en fluido de las glándulas accesorias pero no en fluido epididimal, lo cual es consecuente con las observaciones que indican que la célula espermática adquiere la mayor parte de su capacidad fecundante durante la eyaculación, proceso en el que se unen los fluidos que provienen de las diferentes glándulas que componen el aparato reproductor del macho.

Se ha determinado que las metaloproteinasas interactúan con las barreras y obstáculos establecidos por las células del cúmulo, zona pelúcida y membrana del oocito. Las metaloproteinasas que provienen del espermatozoide, son liberadas durante la reacción acrosómica lo que facilita la fusión de las membranas espermato-ooocito. Al parecer, proteínas de alto peso molecular como la clusterina de 80 kDa inhiben ciertas metaloproteinasas lo que daría lugar a un tipo de control entre las proteínas del plasma seminal (Moura, 2007).

De otra parte, los puntos que probablemente correspondan a proteínas aSFP solo se lograron detectar en plasma seminal de toros Sanmartinero. Se ha reportado la presencia de aSFP en fluido de las glándulas accesorias y en plasma seminal, lo que sugiere que estas proteínas, como la mayoría, se adhieren al espermatozoide durante la eyaculación. Trabajos en porcinos han determinado que las proteínas aSFP se unen al espermatozoide eyaculado pero se pierden durante la capacitación espermática, lo cual indica que, al menos en semen de cerdos, las proteínas aSFP no participan en la interacción espermato-ooocito (Caballero et al., 2005).

En 1993 Eispánier y Calvete encontraron que aislados de proteína de plasma seminal contenían una proteína específica de 13 kDa, la cual estimulaba la división celular (lo que podría ser un nuevo factor de crecimiento) y la secreción de progesterona en células ováricas cultivadas *in vitro*. Mediante el uso de HPLC con columnas de fase reversa C 18, determinaron en la proteína la presencia de 4 cisteínas formando dos puentes bisulfuro entre residuos vecinos. A través de una combinación de isoelectroenfoque y técnicas de identificación de grupos específicos sulfhidrilo, se detectaron tres isoformas de aSFP, una completamente oxidada con pI de 4.7, otra parcialmente oxidada con pI de 4.8 y una última completamente reducida con pI de 5.1.

Lo anterior sugiere que la presencia de los dos pares de cisteína con diferente reactividad en la proteína puede ser la responsable de la protección del espermatozoide bovino al daño oxidativo, dado que posee un comportamiento

tendiente hacia la oxido-reducción (Tedeshi, 2000). Según las bases de datos internacionales, las proteínas aSFP, presentan cerca del 40% de homología en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la espermadhesina Z13. Sin embargo, las aSFP con 114 aminoácidos cuentan con 4 cisteínas que forman dos puentes bisulfuro cuyo azufre puede estar parcialmente oxidado, lo que le otorga la posibilidad de oxidarse o reducirse en presencia de radicales, protegiendo al espermatozoide contra el daño ocasionado por estrés oxidativo (Anexo 6). Según esto, es posible que la presencia de proteínas aSFP, solo en semen de toros de raza Sanmartinero, otorguen cierta protección a las células espermáticas de toros de esta raza, lo que podría explicar en parte los mayores valores de viabilidad espermática del semen de Sanmartinero con respecto al semen de Cebú y podría ser parte de la razón de la superior fertilidad de la raza criolla.

Perfiles electroforéticos de proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú (grupo experimental)

Cuando se compararon las cantidades relativas, entre razas, de los puntos de proteína que posiblemente correspondan a proteínas BSP, Clusterina, Espermadhesina Z13, TIMP-2 y aSFP, la raza Sanmartinero presentó mayores porcentajes ($p < 0.05$) en los puntos que posiblemente sean proteínas BSP de 30 kDa y en los que pueden ser clusterina.

Este grupo de proteínas BSP de 30 kDa se presentan como un conjunto de puntos que pueden isoformas de la misma proteína. Se ha determinado que las isoformas en agrupaciones de puntos se presentan por las diferentes modificaciones postraduccionales de las proteínas. En este sentido, aunque la secuencia de la proteína puede ser la misma, los diferentes niveles de glicosilación y/o fosforilación afectan el punto isoeléctrico de las proteínas y en algunos casos éstas se presentan en series de puntos con el mismo peso molecular pero diferentes pls.

En el 2006, Moura determinó que las cantidades relativas de proteínas BSP de 30 kDa, presentaron asociaciones cuadráticas con los índices de fertilidad de 37 toros Holstein, fertilidad medida como los índices de no retorno al estro de 269 dosis seminales usadas en inseminación artificial. Tal investigación propuso que la relación entre las BSP de 30 kDa y la fertilidad puede deberse a la habilidad de estas proteínas para modular la capacitación espermática, habilidad que está influenciada por una potencial interacción con otras proteínas como la albúmina, las fosfolipasa A2 y otras proteínas del plasma seminal bovino, provenientes de los fluidos de las glándulas accesorias. En este sentido parte de la explicación de una superioridad en la fertilidad del semen de raza Sanmartinero con respecto al cebú, podría explicarse a partir de una mayor concentración relativa ($p < 0.05$) que exhiben algunos puntos de proteínas, especialmente los que posiblemente correspondan a las BSP de 30 kDa.

Por su parte también se detectaron mayores cantidades de clusterina en plasma seminal de toros Sanmartinero. En condiciones no denaturantes, la clusterina es un heterodímero con peso molecular entre 75 y 80 kDa en la cual cerca del 30% de su estructura son carbohidratos. Los análisis de la secuencia predicen que ésta proteína contiene una región enlazada por puentes bisulfuro flanqueada por dos subunidades que contienen tres hélices anfipáticas y dos hélices en espiral, la cual conserva del 70 al 80% de homología en la secuencia de diferentes mamíferos (Wilson, 2000). La clusterina es una proteína que logra llegar al plasma seminal desde el epidídimo y parece acompañar a los espermatozoides incluso antes de la eyaculación (Ibrahim, 1999), lo que sugiere que ésta proteína está implicada en la maduración espermática. En el 2002, Sullivan demostró que los espermatozoides mantenidos en fluido epididimal producido por cultivos celulares de tejido epididimal pueden sobrevivir incluso durante días, cuando se adicionan en dosis de 2×10^6 espermatozoides por mililitro de fluido. En éste caso se observó que existe una asociación estrecha entre la sobrevivencia espermática prolongada y la unión de las secciones ecuatoriales y apicales de los espermatozoides a las células epiteliales. Lo anterior sugiere que la clusterina podría regular las funciones espermáticas antes de que el espermatozoide deje el epidídimo.

En otro aspecto, tal y como se reportó en toros control, el punto de proteínas que posiblemente corresponda a las aSFP, solo se presentó en el plasma seminal de toros Sanmartinero. El punto denominado "1001" con peso molecular de 12 kDa y punto isoeléctrico de 4.3, parece ser exclusivo del plasma seminal de estos toros en el presente trabajo.

En el 2004, Jobim y Oberst encontraron un punto de proteína de 12 kDa y pI 4,8 en geles de plasma seminal de 16 *Bos Taurus* adultos. Según el estudio de Jobim, este punto de proteína se presentó en mayor cantidad y frecuencia en el plasma seminal de toros clasificados con alta facilidad de congelación. El parámetro de facilidad de congelación se midió por la tasa de eyaculados con las características mínimas de calidad post-congelación: Motilidad superior al 30%, viabilidad superior al 45%, total de defectos mayores menor al 20% y defectos menores inferior al 25 %, sugeridas por la Escuela Brasileira de Reproducción Animal (Belo Horizonte, Brasil). El punto de proteína de 12 kDa que se encontró en el trabajo mencionado, presentó una secuencia N-terminal idéntica a la reportada para las proteínas ácidas del plasma seminal aSFP. Según lo anterior, altos índices de congelabilidad de semen y calidad seminal post-descongelación pueden explicarse por la habilidad que presentan las aSFP de proteger al espermatozoide contra el daño en la membrana provocado por estrés oxidativo, proveniente de la peroxidación lipídica que disminuye sustancialmente la viabilidad de la célula espermática durante el proceso de criopreservación.

El hecho de que los posibles puntos de proteínas aSFP solo se presenten en plasma de toros Sanmartinero sugiere la posibilidad de que la calidad seminal post-descongelación de éste semen puede ser superior a las de toros Cebú y

además puede contribuir a explicar en cierta medida la mayor viabilidad espermática de toros Sanmartinero, presentada en éste trabajo. Esto podría explicar igualmente los mayores porcentajes de penetración de oocitos *In vitro* presentados por la raza en trabajos anteriores (Alza y Jimenez, 2000).

Según expuesto hasta el momento, existe la posibilidad de que el punto 1001 sea precisamente una isoforma de la proteína aSFP. En este sentido, la presencia exclusiva de esta proteína en el plasma seminal de toros Sanmartinero y la mayor frecuencia de aparición dentro de los toros analizados, lograría explicar en buena parte una mayor viabilidad espermática de los toros Sanmartinero, lo que explicaría la mayor fertilidad presentada por los toros de esta raza frente a la presentada por los toros Cebú en otros experimentos. Sin embargo, se debe realizar la secuenciación del punto 1001 para constatar la homología frente a la secuencia reportada en las bases de datos.

En caso de que el punto 1001 corresponda efectivamente a una proteína aSFP, la presencia de ésta proteína solamente en perfiles de plasma seminal de toros Sanmartinero, otorgaría a los espermatozoides de estos toros una mayor protección frente a la peroxidación lipídica, una de las causas más importantes de muerte espermática. Se ha establecido que los parámetros funcionales del espermatozoides son afectados por las especies oxígeno- reactivas (ROS) como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el anión superóxido (O^-) y los radicales hidroxilos ($\cdot OH$) (Aitken, 1995). Estas sustancias son fuertes agentes oxidantes producidos durante la respiración celular, por espermatozoides anormales y/o muertos y en el tracto genital de la hembra como respuesta inmune de las células fagocitarias (Henkel, 2005). El hecho de que en este trabajo, las posibles proteínas aSFP solo se expresen en plasma seminal de toros Sanmartinero, sugiere que los espermatozoides de ésta raza poseen una protección adicional frente a estos componentes degradativos que afectan la organización y función de los componentes celulares. Aunque es solamente un espermatozoide el que llega a fecundar el oocito, las probabilidades de que éste espermatozoide llegue intacto y sea funcional dependen en gran medida de las condiciones del plasma seminal, y de la protección que éste logre brindar a la célula espermática. La presencia de aSFP en plasma seminal de Sanmartinero exclusivamente indica que las probabilidades de que los espermatozoides sean funcionales el momento de la fecundación son mayores frente a las del Cebú, lo que se traduce en una mayor fertilidad.

Cuando se compararon los puntos que coinciden en los mapas electroforéticos de plasma seminal de las dos razas, diez puntos presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) siendo cinco con mayor cantidad en Sanmartinero y cinco con mayor cantidad en Cebú.

El punto "4102" (peso molecular 15,26 y punto Isoeléctrico 5,67) presentó mayor cantidad en el plasma seminal de toros de raza Sanmartinero. En el año 2000,

Tedeshi evidenció la presencia de una banda de proteína de 13 kDa con una estructura entre 40 y 50% similar a una proteína aSFP, la cual purificada presentaba la capacidad de unirse al espermatozoide bovino por su afinidad con la heparina. Tedeshi encontró que en condiciones no reductoras, la banda que contiene esta proteína se presentó como un dímero de 26 kDa, la cual se convierte en monómero de 13 kDa cuando se somete a condiciones desnaturalizantes. Aunque es probable que la proteína nativa funcional sea el dímero de 26 kDa, el nombre que se dio a esta proteína fue Espermadhesina Z13, por su peso molecular y su capacidad de adherencia a la célula espermática. Aunque la purificación y ensayos de funcionalidad de la proteína se hicieron hasta el 2000, en 1993 Killian ya había reportado la presencia de dos proteínas relacionadas con capacitación espermática, una de ellas con características similares a la espermadhesina Z13, las cuales se presentaron en mayor cantidad y frecuencia en toros de raza Holsteín con altos índices de fertilidad. Posteriormente, se reportó que precisamente la Espermadhesina Z13, cuyo peso molecular y punto isoeléctrico teórico son cercanos a los obtenidos en la presente investigación (tabla 4), tiene proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú el espermatozoide, participando en los procesos de motilidad y capacitación espermática (Tedeshi, 2000). Así mismo, se ha reportado que espermatozoides incubados *in vitro* con esta proteína purificada, disminuyen sustancialmente su motilidad masal e individual (Moura, 2006), cuando la dosis de proteína adicionada es muy alta. La regulación de la motilidad está estrechamente relacionada con la regulación de la capacitación en diferentes partes del oviducto y parece ser que no es la única proteína que interviene en estos procesos modulatorios.

Proteínas de plasma seminal y calidad seminal

El análisis de correlación determinó que el punto denominado como "4104", presentó el más alto coeficiente de correlación de todos los puntos analizados, probablemente corresponda a una proteína perteneciente al grupo de las BSP. La caracterización de las proteínas BSP ha determinado que experimentalmente tienen peso molecular de 16,8 y punto isoeléctrico de 5,1, valores que pueden variar de acuerdo a los grados de glicosilación (Manjunath, 2010). El presente trabajo evidencia valores similares en cuanto a los dos parámetros (16,2 y 5,5 respectivamente) lo que sugiere que éste punto muy posiblemente haga parte de esta familia de proteínas. La familia de las BSP tiene pesos moleculares relativamente bajos (12-30 kDa), y pueden tener diferentes grados de glicosilación e incluso en ocasiones se han encontrado sin glicosilar (Gwathmey, 2003). Manjunath, en 1993 logró identificar cuatro proteínas designadas como BSP A1, BSP A2, BSP A3 Y BSP 30KDa. Después de determinar su estructura, las BSP A1 y A2 se designaron como proteínas PDC 109, las cuales son las más abundantes dentro de las proteínas del plasma seminal bovino. Las PDC 109 son polipéptidos de 109 aminoácidos formados por dos dominios de fibronectina tipo II precedidos por un dominio N-terminal en el residuo 23. Se ha determinado que la cadena peptídica de las PDC 109 está alineada en dos pliegues beta

antiparalelos que se extienden perpendicularmente, y dos espirales irregulares que soportan un sitio hidrofóbico. Los dominios de fibronectina demuestran una habilidad especial para unirse a los lípidos (Sanchez, 2004).

Se ha evidenciado que la fibronectina tipo II tiene afinidad para unirse, entre otras, a moléculas de heparina y colágeno por el dominio N-terminal. Se conoce que la heparina es un inductor de la capacitación y de la reacción acrosómica, lo cual promueve la idea de un papel importante de las proteínas PDC-109 en la regulación de la capacitación. En el 2004, la industria biotecnológica desarrolló una prueba de fertilidad en toros basada en la presencia o ausencia de una proteína que se encuentra en toros de fertilidad superior (McCauley y Dawson G, 2004). Esta prueba usa anticuerpos monoclonales para reconocimiento de proteínas de la familia HBPs (Heparine Binding Proteins) que para algunos constituye uno de los más importantes factores en la fertilidad del espermatozoide bovino. En esta prueba, el plasma seminal se adiciona a un dispositivo que contiene el anticuerpo, y la presencia de esta proteína, superior a una concentración determinada es indicada por una línea que aparece en una pequeña pantalla del dispositivo, mecanismo similar a las pruebas de embarazo convencionales. Aunque las características específicas en cuanto a estructura y función de estas proteínas permanecen ocultas por efectos de producción, la afinidad con la heparina proporciona una idea sobre su estructura y sobre la posibilidad de que, en efecto, se trate de proteínas PDC 109 o BSP de 30 Kda.

Entre otras funciones, se ha encontrado que las proteínas PDC 109, promueven la unión del espermatozoide al epitelio del oviducto, formando reservorios espermáticos en la superficie de las células epiteliales oviductales, por interacción con residuos de fucosa. Los espermatozoides depositados en el tracto reproductivo de la hembra son atrapados en el segmento inicial del oviducto por interacción con las células epiteliales, manteniendo la viabilidad y la motilidad del espermatozoide hasta la ovulación mediante la regulación de la capacitación, y previniendo la poliespermia por cuanto solo permite que un pequeño número de espermatozoides alcance al oocito (Yanagimach., 1994).

De otra parte, existe evidencia de que las proteínas PDC 109 promueven el flujo del colesterol en los espermatozoides bovinos, lo cual confiere un papel importante en la regulación de la capacitación (Therien, 1999). En el epitelio oviductal, la albumina y residuos de fucosa se adhieren a la membrana espermática en la formación de los reservorios oviductales, específicamente a las proteínas PDC 109, que por su parte tienen afinidad por los residuos de colina de los fosfolípidos de la membrana espermática.

De otro lado, en el mapa electroforético de proteínas del plasma de Sanmartinero, las cantidades relativas de un punto de proteína señalado con el número "3101", cercano al anterior (con peso molecular de 13,52 y pl 5,17), que probablemente también pertenezca a la familia de las proteínas BSP, presentaron coeficientes de correlación de 0,40 y 0,48 ($p < 0.05$) con la motilidad y la concentración espermática respectivamente. La idea de que este punto de proteína corresponda

a un tipo de BSP, no solo se apoya en la posición del punto en el gel (peso molecular y punto isoeléctrico) sino además en la relación que se logró determinar con éstos parámetros de calidad seminal.

En el 2008, se logró determinar los patrones de adhesión de las proteínas PDC-109 (BSP A1 y A2) al espermatozoide bovino mediante inmunocitoquímica y microscopía laser (Souza et al., 2008). Los resultados demostraron que la adhesión de proteínas fue mayor en la parte media de la célula espermática, región en la cual se localizan las mitocondrias (Anexo 7). Se sabe que existe una relación entre la actividad mitocondrial y la motilidad espermática por cuanto la energía necesaria para el movimiento espermático proviene precisamente de las mitocondrias.

La inmunofluorescencia intensa en la pieza media del espermatozoide, mayor que en otras regiones, sugiere una relación cercana con la estimulación de la actividad ATP-asa en la membrana del espermatozoide, lo cual puede tener relación con la activación de la hipermotilidad en la capacitación. En consecuencia, es posible que las proteínas PDC-109 tengan un papel múltiple en la preparación del espermatozoide para la fertilización, ayudando a mantener la viabilidad espermática y simultáneamente regulando la motilidad espermática antes y después de la capacitación.

Contrario al plasma seminal de sanmartinero, un punto de proteína de MW 13.2 kDa y pl 4.9, identificado como 2102, presentó correlación negativa ($r= 0,41$ $p<0,05$) con la viabilidad espermática en semen de toros Cebú. Este punto al parecer corresponde a la BSP A3. Las proteínas BSP A3 tienen la misma secuencia de las PDC 109, pero no presentan glicosilación, por lo cual presentan un peso molecular menor (Anexo 8). Gatheway y Manjunath, en el 2003, lograron evidenciar que, en presencia de fluidos oviductales, las proteínas BSP A3, así como las BSP de 30 kDa, aumentan el índice de adhesión de los espermatozoides al epitelio oviductal, sin embargo un exceso de BSP A3 en solución puede inhibir ésta interacción celular, a través de la inhibición competitiva por dosis, posiblemente por la ausencia de glicosilación en las PDC 109. Se ha demostrado que la ausencia de glicosilación aumenta el potencial negativo en la superficie de la célula espermática, lo cual hace que las proteínas BSP A3 se muestren menos efectivas al estimular el flujo de colesterol y fosfolípidos en la membrana plasmática durante la capacitación (Therien, 1999). Desde éste punto de vista se podría explicar la relación negativa existente entre las cantidades relativas de un punto que presumiblemente es una proteína BSP A3 y la viabilidad espermática menor en toros de raza Cebú.

De otra parte, las cantidades relativas de dos puntos de proteínas identificados como 4104 y 4102 con puntos isoeléctricos de 5.5 y 5.7 y pesos moleculares de 16.2 y 15.3, presentaron en el plasma seminal de toros de raza Sanmartinero, una correlación alta (0.996 $p<0.05$) entre ellos. En el 2009, Barajas encontró un punto de proteína en plasma seminal de toros Sanmartinero. Éste tuvo un peso

molecular de 15,46 con pl de 5, 51 y presentó una correlación positiva con la viabilidad espermática ($r=0,51$ $p< 0,001$), de forma similar a el punto 4104 que se logró identificar en la presente investigación. El punto 4104 coincide con las características de las proteínas BSP, es probable que éste punto corresponda a una isoforma de PDC 109, y por su parte el punto 4102 por sus características puede corresponder a la espermadhesina Z13. La relación existente entre dos proteínas de bajo peso molecular, de las cuales se ha demostrado que tiene relación con la capacitación espermática (Therien, 1999; Manjunath, 1999; Moura, 2006; Moura, 2007), plantea la posibilidad de un mecanismo de regulación entre proteínas. Las espermadhesinas se han detectado en diferentes especies (cerdo, caballo, toro y carnero), su función y patrones de actividad biológica, así como las variaciones en secuencia y grados de glicosilación, sugieren que subpoblaciones de espermadhesinas pueden unirse directamente a los lípidos de la membrana plasmática de forma similar a las proteínas BSP.

Se ha demostrado que espermadhesinas purificadas pueden inhibir la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida (Calvete, 1996). De otro lado, la afinidad de las espermadhesinas por galactosidos y heparina y la capacidad de unión al capuchón acrosomal durante la eyaculación, sugieren una participación activa y fundamental en los procesos de regulación de la capacitación espermática. Algunos trabajos han descrito que las espermadhesinas ligadoras de heparina hacen parte de un complejo que inhibe la motilidad espermática dándole a las espermadhesinas una función anti-motilidad, similar a las proteínas BSP. Las semejanzas entre las funciones biológicas de las proteínas BSP y espermadhesinas, además de su capacidad ligadora de heparina, pueden explicar la alta correlación que presentan los dos puntos.

En investigaciones anteriores (Barajas, 2009), se encontró un punto identificado como "1441" con peso molecular 28,2 y pl 4,17, con características muy similares a los puntos encontrados en éste trabajo que pueden ser proteínas BSP de 30kDa. El trabajo de Barajas logró evidenciar que éste punto presentó una mayor cantidad relativa en mapas electroforéticos de plasma seminal colectado en épocas de lluvia, señalando la posibilidad de que efectos de protección contra estrés térmico por frío.

Conclusiones

La presente investigación evidenció diferencias importantes en cuanto a calidad seminal, perfiles proteicos y cantidades relativas de proteínas expresadas en el plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú, mantenidos bajo las mismas condiciones de alimentación y manejo. Las muestras seminales de toros Sanmartinero presentaron mayores valores de viabilidad y concentración espermática, resultados que corroboran los hallazgos de los estudios de fertilidad *in vitro*, realizados con anterioridad usando toros de las mismas razas.

La concentración de proteínas en plasma seminal de las dos razas, aunque no presentó diferencias significativas, demostró un comportamiento lineal en semen de toros Sanmartinero mientras en Cebú se evidenció un aumento progresivo a través de los muestreos.

En cuanto a los perfiles electroforéticos, en el plasma seminal de los toros evaluados se logró identificar grupos de puntos que coinciden con las características de proteínas específicas reportadas en investigaciones internacionales. Proteínas como las BSP A1, A2, A3; BSP de 30 kDa, Monómeros de Clusterina, Espermadhesina Z13, se identificaron en los perfiles de las dos razas, mientras que las proteínas aSFP solo se detectaron en semen de toros Sanmartinero. Estas últimas proteínas pueden ser responsables, en parte, de la superior viabilidad que presentó el semen de Sanmartinero, dado que su estructura y actividad biológica se ha relacionado con la protección del espermatozoide ante el estrés oxidativo.

La comparación de los perfiles electroforéticos de plasma seminal de las dos razas evidenció la presencia de 75 puntos en Sanmartinero y 67 en Cebú, en su mayoría de pH ácido y de los cuales 11 puntos son exclusivos de toros Sanmartinero y 15 exclusivos de Cebú. De los puntos comunes, uno presentó cantidad superior en Sanmartinero (M_w 15.3 y pI 5.7), que coincide con las características de la espermadhesina Z13, cuya actividad biológica se relaciona con la regulación de la capacitación espermática y la interacción con la zona pelúcida, lo cual puede contribuir a explicar la fertilidad superior de los toros Sanmartinero reportada por otros investigadores.

El punto de proteína de peso molecular 16.2 y pI 5.5, presentó una importante correlación ($r=0.64$ $p<0.001$) con la viabilidad espermática de los toros Sanmartinero. El peso molecular y punto isoeléctrico de este punto de proteína, coinciden con los de las proteínas BSP A1/A2, ampliamente caracterizadas y cuya función biológica está relacionada con la regulación de la capacitación espermática y, en algunas especies, parece tener efecto de protección y recuperación de la membrana espermática en el proceso de criopreservación. Es posible que el uso de estas proteínas específicas como aditivo en medios de criopreservación, contribuya al aumento de la viabilidad post descongelación del semen bovino.

Por último, se encontró una alta correlación entre el punto que posiblemente corresponda a una proteína BSP A1/A2 y el que coincide con las características de la Espermadhesina Z13, lo que sugiere que entre éstas dos proteínas existe un efecto sinérgico de regulación, que probablemente este mediando los procesos de capacitación espermática. Esta relación podría resultar en un complejo proteico que asegure que la célula espermática no llegue a capacitarse de forma prematura.

Recomendaciones

En el trabajo se pretende encontrar proteínas del plasma seminal relacionadas con la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide de toros Cebú y Sanmartinero sometidos a criopreservación. Aunque la viabilidad espermática es un parámetro de calidad seminal y no de fertilidad, los futuros trabajos proteómicos que involucren semen bovino podrían ser relacionados con pruebas de fertilidad *in vitro* e *in vivo*, de manera que se logren establecer correlaciones entre proteínas específicas y fertilidad en bovinos. Así mismo, la cantidad relativa de proteínas específicas o grupos de proteínas pueden usarse para establecer modelos de predicción de la fertilidad que puedan disminuir el tiempo que requiere la selección de un macho reproductor e incluir estos modelos en programas de mejoramiento del hato bovino.

De otro lado, la determinación y caracterización de proteínas específicas del plasma seminal y la membrana espermática de espermatozoides bovinos, relacionadas con el potencial protector contra estrés térmico y oxidativo, podrían ser aisladas, purificadas y usadas para la elaboración de aditivos de uso potencial en protocolos de criopreservación.

Bibliografía

ALZA A. Evaluación de la fertilidad del semen congelado de la raza Cebú, Blanco Orejinegro y Costeño con cuernos mediante las pruebas de penetración espermática de oocitos bovinos *in Vitro* y reacción acrosómica *in Vitro*. Trabajo de grado, Veterinario. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Veterinaria, 2000. 138 p

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction and Fertility Development*. 1995, 7: 659–68

BEDOYA, D. Inducción de la reacción acrosómica *in vitro* para la evaluación de la capacidad fertilizante de espermatozoides criopreservados en toros de las razas Sanmartinero y Cebú Brahman. Bogotá. Trabajo de grado Medicina Veterinaria. Bogotá: Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 1999, 140 p

BARAJAS, D P., COY, P., VELÁSQUEZ, JG., RUEDA, F., HERRERA, R., CARDOZO, J.A. Proteínas del plasma seminal asociadas con la fertilidad de toros criollos Sanmartinero y Cebú en condiciones del trópico colombiano. Memorias Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe SIRGELAC. 2009. P 153-154

CABALLERO, I., VAZQUEZ, J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., GILL, M.A., CALVETE, J.J., SANZ, L., GARCIA, E.M., ROCA, J., MARTINEZ. Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. *Zygote*. 2005, 13: 11-16

- CALVETE, J., VARELA, P., SANZ, L., ROMERO, A. A Procedure for the Large-Scale Isolation of Major Bovine Seminal Plasma Proteins. En: Protein Expression and Purification. 1996, 8: 48–56
- EINSPANIER, T., KRAUSEB, I., CALVETE, J., KLOSTERMEYER, H., KARG, H. Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. FEBBS letters. 1994, 344: 61-64
- KILLIAN, J., CHAPMAN, D., ROGOWSKY, L. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. Biology of Reproduction. 1993, 49: 1202-1207
- GRASA, P., PEREZ, P., BÁGUENA, O., FORCADA, F., ABECIA, A., CEBRIAN, J.A., MUIÑO-BLANCO, T. Ram sperm selection by a dextran/swim up procedure increase fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. Journal of Andrology. 2004, 25, 6: 982-989
- GWATHMEY, T. M. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. Biology of Reproduction. 2003, 69: 809-815
- HENKEL R. The impact of oxidants on sperm function. Andrologia. 2005,37: 205–206
- IBRAHIM, M. Reproductive Tract Secretions and Bull Spermatozoa contain different clusterin Isoforms that cluster cells and inhibit Complement-induced Cytolysis. En: Journal of andrology. 1999, Vol 26, p 230-240
- Bibliografía DE JARNETTE, MS. The Effect of Semen Quality on Reproductive Efficiency. Veterinary clinics food animal practice. 2005,25: 409–418
- JOBIM, M., OBERST, E.R., SOUZA, O. Two-dimensional polycaylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their correlation with semen freezability. Theriogenology. 2004, 61: 255-266
- McCAULEY, T., DAWSON, R. Developing and validating a lateral-flow Cassette for fertility diagnostics in bulls. IVD Technology. 2004,10: N. 3
- MANJUNATH, P., SAIRAM, M. Purification and Biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP A1, A2 y A3) in bovine seminal plasma. Journal of Biochemistry. 1987, 241: 685-692
- MANJUNATH, P., CHADONET, E. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. Biology of Reproduction. 1993, 49: 27-37

MANJUNATH, P., THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids binding proteins in sperm membrane lipids modification that occurs during capacitation. *Journal of reproduction and immunology*. 2002, 53: 109-119

MANJUNATH, P., LEFEBVRE, J., WRIGHT, W. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biology of reproduction*. 2010, 80: 394-397

MEDINA, F., PEREZ, E. Efecto de la temperatura sobre la penetración espermática y la fertilidad in vitro en toros de razas Romosinuano, Holstein y Brahman en oocitos bovinos de matadero. Trabajo de grado, Veterinario. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Veterinaria, 1998. 176 p

MORTARINO, M., TEDESCHI G., NEGRI. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú 797-801

MOSHETA, B. Proteínas de plasma seminal e sua relação com características espermáticas e nível sérico de testosterona em touros de raça Nelore. Trabajo de grado, MsC. en ciencias veterinarias (producción animal). Uberlândia. Universidad Federal de Uberlândia. Brazil, 2006. 32 p

MOURA, A., HASAN, K. Identification of proteins in accessory Sex Gland Fluid associated with fertility indexes of dairy bulls. *Journal of Andrology*. 2006, 27: 201-212

MOURA, A., CHAPMAN, D., KILLIAN A. Proteins of the Cauda Epididymal Fluid Associated With Fertility of Mature Dairy Bulls. *Journal of Andrology*. 2006, 27, N.4: 534-541

MOURA, A., CHAPMAN, D., KILLIAN A. comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*. 2007 vol 98

REYES, C., BOILARD, M., SULLIVAN, R. Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. *Molecular Reproduction Development*. 2002. 63: 500-509

RUEDA, F., ABADÍA, B., CARDOZO, J. Componentes bioquímicos de semen de toros de razas criollas en el trópico Colombiano. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2007, 20: n 4, 668

RUEDA, F., CARDOZO, J. Actividad enzimática de la aspartato-aminotransferasa y su relación con la calidad seminal en toros de tres razas bovinas criollas colombianas. *Revista Corpoica-Ciencia y tecnología agropecuaria*. 2008, 9 No. 1: 88-92

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia?. *Reproduction in Domestic Animals*. 2003, 38: 312-318

SANCHEZ, S. Interaction of PDC 109, the major secretory proteins from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane. *Journal of Andrology*. 2004, 25: 234-244

SOUZA, C., MOURA, A. KILLIAN, G. 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. En: *Animal Reproduction Science*. 2008. Vol 105, p 72–89

SULLIVAN, R., REYES-MORENO, C., BOILARD, M. Characterization and Identification of Epididymal Factors That Protect Ejaculated Bovine Sperm During In Vitro Storage. *Biology of reproduction*. 2002, 66, N 1: 159-166

SWAMY, M. Interaction of bovine seminal plasma proteins with model membranes and sperm plasma membranes. *Current Science*. 2004, 87: 103-211

TEDESCHI, G., OUNGRE, E., MORTARINO, M., NEGRI, A., MAFFEO, G., RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *European Journal of Biochemistry*. 2000, 267: 6175-6179

THERIEN I, MOREAU R, MANJUNATH P. Bovine seminal plasma Phospholipidbinding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*. 1999, 61: 590–598

URFER, W., JUNG, K. Statistics for proteomics: A review of tools for analyzing experimental data. *Practical proteomics*. 2006, 1: 48-54

WILSON, M., EASTERBROOK. S.B. Clusterin is a secreted mammalian Chaperone. Resumen y abstract enC Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú

YANAGIMACHI R., "The Physiology of Reproduction", Ed. J.D Neills. 1994

Capítulo 3

Efecto de la adición de proteínas del plasma seminal en la integridad de la membrana de espermatozoides de toros sanmartinero y cebú sometidos a criopreservación

Resumen

Esta investigación evalúa el efecto de la adición de proteínas del plasma seminal bovino, en la reversión del daño en la membrana espermática provocado por la criopreservación. Se midió la viabilidad post-descongelación de pajillas congeladas con medio citrato-fructosa y medio comercial Bioxcell®, descongeladas e incubadas con diferentes cantidades de fracciones de plasma seminal, obtenidas mediante cromatografía de exclusión. La electroforesis bidimensional confirmó la presencia de siete puntos (peso molecular de 14-16 kDa y punto Isoeléctrico de 5.0 - 5.5) en las fracciones contenidas entre los tubos 20-25 de la separación cromatográfica. Las características de tres puntos coinciden con las reportadas internacionalmente para proteínas BSP. La incubación de espermatozoides con proteínas contenidas en las fracciones 20-25, demostró que la viabilidad espermática post descongelación aumenta 20% cuando se usan dosis de 1 a 1.5 mg/ 10⁶ en espermatozoides, previamente congelados con medio citrato fructosa y 25% cuando se usan dosis de 0.5 mg/10⁶ espermatozoides congelados con medio Bioxcell®, indicando un efecto de reversión del daño ocasionado por los procesos de criopreservación, efecto que depende del medio usado para la congelación. Las diferencias en los porcentajes de reversión de espermatozoides de Sanmartinero y Cebú, evidenciaron que éstos fueron más altos en toros Sanmartinero (18%) que en Cebú (6.8%). Aunque el efecto de recuperación de la membrana depende de factores como la dosis, el medio crioprotectante y la raza, estos hallazgos contribuyen al desarrollo de protocolos que incluyan proteínas del plasma seminal para criopreservar semen bovino.

Abstract

This research evaluates the effect of bovine seminal plasma proteins, in the reversion of sperm membrane damage, caused by cryopreservation. We measured post-thaw viability of frozen straws of citrate-fructose medium and commercial Bioxcell®. The straws were thawed and incubated with different doses of seminal plasma fraction obtained by exclusion chromatography. Two-dimensional electrophoresis confirmed the presence of seven spots (molecular weight 14-16 kDa and Isoelectric point 5.0-5.5) in 20-25 tubes from exclusion chromatography. The features of three points coincide with those reported internationally as BSP proteins. Incubation of spermatozoa with proteins contained

in fractions 20-25, showed that sperm viability increased 20% when using a dose of 1.5 mg / 10⁶ sperm, frozen by citrate-fructose medium 25% when used in doses of 0.5 mg/10⁶ sperm, frozen by Bioxcell[®] medium, indicating a medium-dependent reversal effect of damage caused by cryopreservation process. The differences between the percentages of reversal damage sperm in Sanmartinero and Cebu, showed that they were higher in Sanmartinero bulls(18%) than in Cebu ones (6.8%). Although the effect of recovery of the membrane depends of factors such as dose, the type of cryopreservation medium and breed, these findings contribute to the development of protocols that include seminal plasma proteins to cryopreserve bovine semen.

Introducción

El plasma seminal bovino es una mezcla de secreciones provenientes de diferentes partes del aparato reproductor del macho. Se sabe de componentes (carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales) presentes en el plasma seminal, que influyen en la capacidad fecundante del semen y pueden explicar la presencia de toros más fértiles que otros. El estudio de estas macromoléculas ha promovido el desarrollo de marcadores moleculares para identificar animales con alto potencial fecundante y hoy en día representa una de las formas para adelantar el mejoramiento genético en animales de granja (Nauc et al., 2000).

Dentro de este conjunto de macromoléculas están las proteínas, de cuyas funciones, estructuras y mecanismo de síntesis, se han arrojado algunos resultados en cuanto al hallazgo de marcadores moleculares para selección de reproductores de alta fertilidad, y el uso en el proceso de criopreservación, de proteínas funcionales que permitan incrementar la viabilidad espermática postdescongelación (Killian, 1993; Barrios, 2000; Moura, 2006). Es así como durante los últimos 25 años se ha realizado una importante cantidad de trabajos enfocados al estudio de la estructura y función del conjunto de proteínas de plasma seminal, que están involucradas en diferentes aspectos fisiológicos en los que se ve envuelta la célula espermática durante su paso por el tracto genital de la hembra (Manjunath y Sairam, 1987; Manjunath, 1993; Killian 1993; Einsapnier, 1994; Calvete, 1996; Gwathmey, 2003; Moura, 2006)

En el plasma seminal existen proteínas de especial importancia en la función fecundante del espermatozoide. Dado que el espermatozoide no posee capacidad fertilizante al momento de la eyaculación sino que la adquiere durante el tránsito a través del tracto genital de la hembra, algunas de las proteínas contenidas en el plasma seminal, deben unirse a la célula espermática gracias a su afinidad con los lípidos presentes en la membrana plasmática, provocando una reconfiguración en la estructura de la misma, proceso conocido como capacitación. Algunos trabajos se han dirigido a un grupo de proteínas ácidas del plasma seminal llamadas proteínas BSP (Bovine Seminal Plasma) las cuales se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide y tienen un papel crucial en la capacitación (Manjunath, 1987; Calvete, 1996; Gwathmey, 2006; Manjunath, 2009) . Estas proteínas, que son secretadas por las vesículas seminales (Desnoyers et al., 1994), están bien caracterizadas con respecto a sus propiedades bioquímicas y estructurales.

Las proteínas del plasma seminal bovino han sido separadas y usadas como posibles agentes protectores del espermatozoide contra el estrés oxidativo. Estas proteínas se han purificado a mediana escala, y se ha encontrado que se relacionan estrechamente con la protección de la membrana del espermatozoide (Calvete et al., 1996). Proteínas como las PDC 109 (también llamadas proteínas BSP A1, A2 y A3) y las Proteínas ácidas del Fluido seminal (aSFP) se purificaron

mediante el uso de cromatografía líquida a partir de plasma seminal bovino completo. El uso de proteínas BSP como aditivos protectores en semen bovino se fundamenta en su abundancia y función. Se ha indicado que las proteínas BSP inducen la modificación lipídica que sufre la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación, proceso que además involucra proteínas como la albúmina presente en gran cantidad en los fluidos ampulares y oviductales, e interacciones con fosfolípidos y colesterol (Ibrahim, 1999).

Las proteínas BSP, además median la unión del espermatozoide al epitelio oviductal en el tracto genital de la hembra, preservando la motilidad y la viabilidad espermática en las criptas del oviducto, antes del encuentro con el oocito, lo que se puede considerar como un efecto anti-capacitante. Durante la capacitación, el espermatozoide deja las criptas del oviducto para continuar su camino hacia el óvulo. lo que implica la interacción de las BSP (en la superficie del Capítulo 3 oide) con la albumina de los fluidos ampulares y oviductales. La albumina retira las proteínas BSP y estas a su vez retiran el colesterol abriendo los canales iónicos y dando lugar al proceso de capacitación, en un efecto considerado como capacitante (Manjunath y Therien, 2002). Lo anterior indica que las proteínas BSP representan un mecanismo protector y desencadenante de la capacitación, regulado en gran parte por condiciones de los fluidos oviductales y que se relaciona estrechamente con la fertilidad y la protección del espermatozoide.

Aunque la composición y cantidad de proteínas de plasma seminal varía según la especie, se ha demostrado que la incubación de espermatozoides *in vitro* con proteínas de plasma seminal, puede prevenir y contrarrestar los efectos deletéreos que se manifiestan en las células espermáticas luego de ser sometidas a choques térmicos o al proceso de criopreservación, además de prevenir y revertir la capacitación prematura, lo cual disminuye la habilidad fertilizante del semen (Cross, 1993).

La idea de que el plasma seminal posee factores regulatorios de la capacitación, han llevado a realizar trabajos de caracterización, aislamiento, purificación y uso en ensayos biológicos de proteínas específicas cuya estructura y función ha sido descrita previamente. La incubación de espermatozoides ovinos con proteínas purificadas por métodos no denaturantes han confirmado la adsorción de importantes proteínas, las cuales revierten los efectos dañinos en espermatozoides expuestos a medios detergentes o incluso sometidos a choques térmicos por bajas temperaturas (Ollero et al., 1997). En este sentido, se ha determinado que una fracción de plasma seminal (denominada fracción 6) separada por cromatografía de exclusión, y que contenía proteínas específicas del plasma seminal, demostró tener efectos de protección y recuperación en espermatozoides ovinos sometidos a choque térmico por frío (Barrios, 2000). El trabajo de Barrios evidenció que espermatozoides ovinos sometidos a choques térmicos e incubados *in vitro* con algunas proteínas del plasma seminal, sufren

modificaciones en la superficie de una célula dañada recuperando sus características funcional. Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú. Según lo anterior, es posible que el uso de aditivos a base de proteínas del plasma seminal, logre revertir en parte los daños causados por los procesos de criopreservación en espermatozoides de toros criollos Sanmartinero y Cebú. Por esta razón, el objetivo del presente estudio se enmarca en la evaluación del efecto de recuperación que pueden presentar los espermatozoides de toros de razas Sanmartinero y Cebú, al ser incubados con fracciones específicas de plasma seminal que contienen proteínas de pesos moleculares equivalentes a los reportados para proteínas BSP A1, A2 y A3.

Materiales y métodos

Unidades experimentales

Esta investigación se adelantó con pajillas de 10 toros de la raza criolla Sanmartinero y 10 de la raza Cebú. Los animales permanecieron en el centro de investigación La Libertad, ubicado en la ciudad de Villavicencio en el departamento del Meta. Los toros seleccionados tenían entre 3 y 4 años de edad, y permanecieron siempre en adecuadas condiciones de salud, bajo condiciones de pastoreo en praderas de *Brachiaria decumbens*.

El semen se colectó por electroeyaculación, determinándose los parámetros convencionales de calidad seminal como viabilidad, motilidad y concentración espermática. La concentración espermática se determinó mediante el método espectrofotométrico usando un Spermacue Minitube[®]. La viabilidad espermática, asumida como la integridad de la membrana, se determinó por el conteo de espermatozoides sometidos a una tinción diferencial Carboxifluoresceína-ioduro de propidio (Harrison y Vickers, 1990). en la cual se diferenciaron los espermatozoides con membrana íntegra (color verde) de los que presentaron membrana espermática dañada (color rojo) bajo microscopio de fluorescencia. La motilidad individual se determinó mediante el análisis visual de una alícuota de 8 microlitros (μL) bajo un microscopio óptico con objetivo de 40x, teniendo en cuenta sólo los espermatozoides con movimiento progresivo en varios campos ópticos.

Criopreservación del semen

La criopreservación del semen realizó mediante dos métodos: Citrato-fructosa con yema de huevo y un medio comercial para congelación (Bioxcell[®], IMV Francia).

Todas las dosis seminales se elaboraron a una concentración de 35×10^6 espermatozoides por dosis y se desecharon aquellas que no tenían un mínimo de motilidad individual progresiva de 40 % post descongelación, después de 48

horas. El medio de criopreservación citrato-fructosa se preparó usando citrato de sodio 29 g/L, fructosa en 12,5 g/L, penicilina en 500 UI, 1 mg de estreptomicina y yema de huevo en la fracción A del diluyente, mientras la fracción B se preparó con 86% de la fracción A y 14% de glicerol. La disminución de la temperatura se hizo de forma progresiva de 20°C a 5°C a razón de 1 °C por minuto. Alcanzada la temperatura de 5°C, se adicionó glicerol, y se mantuvo el semen en refrigeración durante 4-6 horas. Las pajillas se llenaron y sellaron con ayuda de una maquina selladora y se introdujeron en termos de nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización. La congelación con el medio comercial Bioxcell® se realizó de la misma forma reemplazando las fracciones A y B de citrato-fructosa por las fracciones 1 y 2 del Bioxcell® comercial. El descenso gradual de la temperatura, así como los tiempos de refrigeración se realizaron de la misma manera con ambos medios.

Colección de plasma seminal y cuantificación de proteínas

El plasma seminal se obtuvo por centrifugación del semen a 10.500 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y el nuevo sobrenadante obtenido se filtró mediante una membrana Millipore 6V de 0,22 µm. Al filtrado se le adicionó fenilmetilsulfonil fluoruro 5µM como agente inhibidor de proteasas y se guardó a -20°C hasta su uso. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas de las muestras de plasma seminal mediante métodos espectrofotométricos a través de un miniespectrofotómetro *nanodrop*, usando el coeficiente de absortividad molar (ϵ) de la albúmina sérica bovina BSA (0,667 para el equipo específico).

Cromatografía de exclusión por tamaño

Las muestras de plasma seminal se filtraron por centrifugación con microconcentradores ultra Amicón de 3 kDa (Millipore®). Las proteínas filtradas se separaron mediante cromatografía líquida de baja presión (Barrios, 2000) con el uso de un cromatógrafo BioLogic LP de Bio Rad con colector de fracciones (Anexo 9). Los procesos de separación cromatográfica se llevaron a cabo en el laboratorio del Grupo de Investigación en Biomoléculas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Pamplona.

La separación de las proteínas se realizó en función de su peso molecular mediante filtración por gel (cromatografía de exclusión). Lo anterior se llevó a cabo con una matriz polimérica de Sephacril S-100 (lavada con NaOH 0,1 M y desgasificada al vacío) como fase estacionaria y buffer fosfato 0,05 M pH 8.0 en NaCl como fase móvil. El NaCl se usó para evitar interacciones iónicas entre el eluyente y las matriz polimérica de separación. Se adicionó 1 ml de plasma seminal que contenía cerca de 160 mg de proteína a un sistema abierto con una columna de 100 cm de largo y 1 cm de diámetro interno de volumen total de 79 ml, para coleccionar fracciones separadas en tubos de 10 ml a flujo de 0,25 ml/minuto.

Se colectaron 50 fracciones en total, cada fracción con volumen de 4 ml y en todas se midió la concentración de proteína mediante el uso de Nanodrop, empleando el coeficiente de absortividad molar de 0,66. Las fracciones del plasma obtenidas de la cromatografía se concentraron a través de una celda de ultrafiltración Amicon (Millipore®), con corriente suave de nitrógeno (Anexo 10). Una vez concentradas, se filtraron de nuevo en microfiltros de 3 kDa para eliminar las sales y se sometieron a liofilización durante 24 horas, luego de las cuales se almacenaron a -20 °C.

Electroforesis unidimensional

La separación electroforética en una dimensión se realizó con base al peso molecular. Esta se hizo en minigeles, con un gradiente de concentración lineal de poliacrilamida de 10% a 20%. Además de la poliacrilamida, los geles se prepararon usando 2,8 microlitros de N,N,N,N Tetrametil-etilendiamina (TEMED), Persulfato de amonio (APS) 1% y Buffer Lower pH 8.8 con dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% y Acido etilendiltetraminoacético (EDTA) 0,5 M. Se cargó 30 microgramos de proteína total en cada pozo del gel y la separación se hizo en una cámara de electroforesis vertical *Miniprotean cell* de *Bio Rad* a 85 voltios durante 180 minutos.

Electroforesis bidimensional

La separación en 2 dimensiones se llevó a cabo primero por puntos isoeléctricos mediante una cámara de isoelectroenfoque *IEF protean* de *Bio Rad* y con el uso de tiras de pH inmovilizado en gradiente (IPGs) con 8 cm de largo y un rango de pH de 4 a 7. Las tiras se hidrataron de forma pasiva (toda la noche) usando un buffer con anfolitos para alcanzar el punto isoeléctrico, y tributilfosfina (TBP). En cada tira se usaron 100 microgramos de proteína total.

La segunda dimensión se realizó en minigeles con un gradiente de poliacrilamida de 10% a 20%. Las tiras se fijaron a los geles mediante agarosa al 1% y azul de bromofenol a 2%. La separación por peso molecular se hizo en una cámara de electroforesis vertical *Miniprotean cell* de *Bio Rad* a 85 voltios durante 180 minutos.

Adición de las proteínas separadas a semen criopreservado

Las proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú se separaron inicialmente por electroforesis bidimensional seguida de una cromatografía de exclusión. Las fracciones obtenidas, que contenían las proteínas de interés, se adicionaron a espermatozoides provenientes de semen criopreservado en pajillas. Se incubaron 1×10^6 células con la fracción específica de proteínas del plasma seminal, eluída por cromatografía de exclusión. Se usaron dosis de 0,5 1, 1,5 y 2 mg de un concentrado de proteínas obtenido de las fracciones 20-25,

resuspendidas en medio MHTF. Adicionalmente se usaron dos controles: MHTF sin proteínas como control negativo y plasma seminal completo como control positivo, para un total de 5 tratamientos. La incubación se realizó a 37 °C durante 1 hora.

Finalizada la incubación, se midió la viabilidad espermática mediante el método del ioduro de propidio-diacetato de carboxifluoresceína (Harrison y Vickers, 1990). Para lograr esto, la muestra seminal se diluyó en MHTF (1:500) y se adicionó diacetato de carboxifluoresceína (10 μM en agua destilada) y ioduro de propidio (7,3 μM en DMSO). Posteriormente se adicionó formaldehído 1,7 mM para la inmovilización de las células con objeto de lograr una mejor observación. Posteriormente la muestra se incubó a 37°C durante 15 minutos y se colocaron 8 microlitros de la muestra sobre una lámina portaobjeto para luego hacer la observación con objetivo 40x en un microscopio con iluminación epifluorescente por medio de los filtros estándar para fluoresceína.

Se contaron 200 células por alícuota, los espermatozoides teñidos de color verde se consideraron viables. El color verde se debe a que, el diacetato de carboxifluoresceína es capaz de penetrar el espermatozoide intacto, debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a este compuesto; en el interior es hidrolizado por esterasas inespecíficas. Los espermatozoides con coloración roja se consideraron inviables, ya que la membrana dañada es permeable al ioduro de propidio, el cual penetra en el interior de la célula coloreándola de rojo intenso (figura 21).

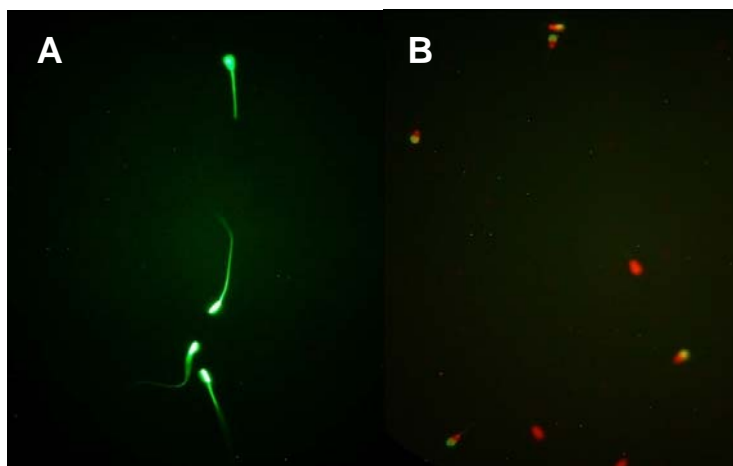


Figura 21. Espermatozoides teñidos con Carboxifluoresceina-Ioduro de propidio.(A). Espermatozoides con membrana espermática íntegra (viables). (B) Espermatozoides con membrana espermática dañada (no viables).

El efecto de la adición de las proteínas específicas del plasma seminal en la viabilidad del espermatozoide post congelación, se determinó mediante la fórmula:

$$\% \text{ reversión} = \frac{(V_{p60} - V_{c60})}{(V_w - V_{c60})} \times 100$$

Donde:

V_w = viabilidad de la muestra fresca antes de la congelación

V_{c60} = viabilidad de la muestra control al cabo de una hora

V_{p60} = viabilidad de la muestra con proteínas al cabo de una hora

Este porcentaje representa la relación entre las células con viabilidad recuperada y las teóricamente recuperables (Barrios, 2000).

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de la dosis del concentrado de la fracción 20-25 se uso diseño completamente al azar:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Porcentaje de recuperación de la viabilidad en las pajillas descongeladas

μ = Media total

α_i = Efecto del tratamiento (dosis de la fracción de plasma seminal)

ϵ_{ij} = Error experimental

Adicionalmente se realizó un análisis de varianza para determinar el efecto de los tratamientos y una prueba de tukey para comparar el porcentaje de recuperación de viabilidad espermática en cada tratamiento.

De otro lado, en el experimento encaminado hacia la comparación de efecto de la adición de la fracción 20-25 en la recuperación de la viabilidad post descongelación en las diferentes razas se uso una prueba de t. Todos los porcentajes de viabilidad se transformaron usando el logaritmo de dicha variable.

Resultados

Separación de fracciones de proteínas de plasma seminal mediante cromatografía de exclusión

Las proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú comprenden pesos moleculares entre 9.2 y 78.5 kDa. Se ha determinado la presencia de un punto de proteína ("4104" Mw 16.2 y pl 5.5) en plasma seminal de toros Sanmartinero, que probablemente corresponde a una proteína BSP A1/A2, y que presenta una correlación importante entre la cantidad relativa (medida en porcentaje) y la viabilidad espermática ($r = 0.64$, $p < 0.05$). En razón a esta relación, se decidió separar mediante exclusión por tamaño, la fracción cromatográfica que

contenía este punto de proteína. Se logró separar fracciones de 4 ml a razón de 0.5 ml por minuto obteniendo entre 10 y 12 picos de proteína (figura 22).

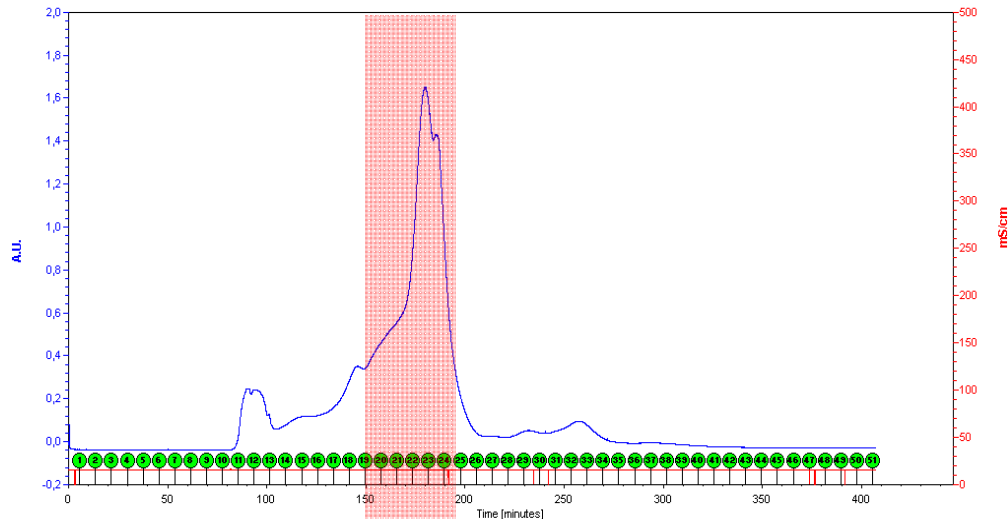


Figura 22. Cromatograma del fraccionamiento de proteínas del plasma seminal mediante cromatografía de exclusión por tamaño se señala el pico más abundante que comprende las fracciones 20 a 25.

Cuando se midió la concentración de proteína obtenida en cada fracción cromatográfica, se hallaron dos grupos de fracciones con concentraciones superiores: los grupos comprendidos por las fracciones 10 a 16 y 20 a 25 (figura 23).

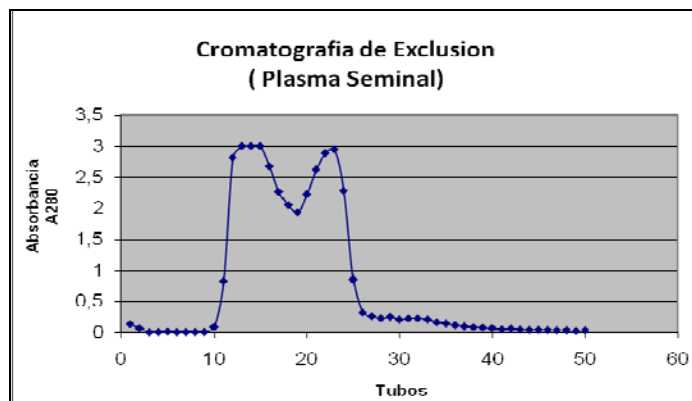


Figura 23. Concentración de proteínas en las diferentes fracciones obtenidas. Las fracciones 10 a 15 y 20 a 25 presentaron las mayores concentraciones.

El pico que comprendió las fracciones 20 a 25, uno de los más grandes, se sometió a electroforesis en una y dos dimensiones para constatar la presencia de punto de proteína de interés (figura 23). Cuando se usaron concentrados de 170 mg/ml de proteína total, se logró obtener entre 90 y 113 mg/ml a partir de los concentrados de las fracciones 20 a 25, lo que representa cerca del 67% de la

muestra de plasma empleada (tabla 13). Lo anterior indica que las fracciones 20 a 25 contienen las proteínas más abundantes en el plasma seminal.

Tabla 12. Concentraciones de proteína en diferentes fracciones (tubos). Las fracciones 20 a 25 contienen la mayor cantidad de proteína (entre 90 y 113 mg/ml)

N° DE TUBO	ABSORBANCIA (280 nm)	TOTAL DE MASA (PROTEINA mg/ml)
10	0,005	0,02
11	-0,005	-0,02
12	0,521	2,084
13	1,258	5,032
14	0,85	3,4
15	0,707	2,828
16	0,84	3,36
17	0,876	3,504
18	1,064	4,256
19	1,649	6,596
20	2,124	8,496
21	2,599	10,396
22	2,893	11,572
23	3	22,612
24	3	35,228
25	3	25,485
26	1,556	6,224
27	0,483	1,932
28	0,307	1,228
29	0,309	1,236
30	0,421	1,684
31	0,429	1,716
32	0,519	2,076
33	0,632	2,528
34	0,625	2,5
35	0,318	1,272

Por ésta razón el pico cromatográfico que comprende las fracciones 20 a 25 se presenta como el más abundante teniendo en cuenta el área bajo la curva. La electroforesis en una dimensión comprueba la separación de la banda de proteínas más gruesa en las fracciones 20 a 25. (figura 24)

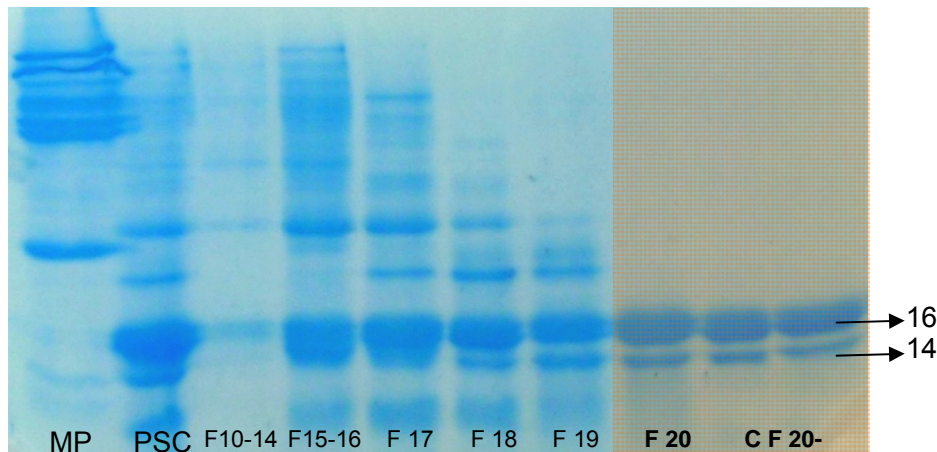


Figura 24. Electroforesis en 1 dimensión de las proteínas obtenidas en las fracciones colectadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Línea 1: Marcador de peso molecular (MP), línea 2: Plasma seminal completo (PSC), línea 3: concentrado de las fracciones 10 a 14 (F10-14), línea 4: concentrado de las fracciones 15 y 16 (F15-16), líneas 5 a 7: fracciones 17, 18 y 19, línea 8: fracción 20 (F20) y líneas 9 y 10: Concentrado de fracciones 20 a 25 (CF 20-25). Se señalan las 3 últimas líneas con bandas de 13 y 16 kDa.

Al someter el concentrado obtenido de las fracciones 20 a 25 a electroforesis bidimensional con rango de pH de 4 a 7, se logró evidenciar la presencia de 7 puntos, además del que presentó correlación en el capítulo anterior (figura 25). El gel en dos dimensiones demostró que las dos bandas de 14 y 16 kDa, mostradas los gels 1D, representan más de una sola proteína específica. Aunque la cromatografía de exclusión por tamaño es útil para una semi-purificación primaria de las proteínas del plasma seminal, la separación de proteínas de peso molecular similar pero punto isoeléctrico diferente requiere de estrategias de separación más específicas.

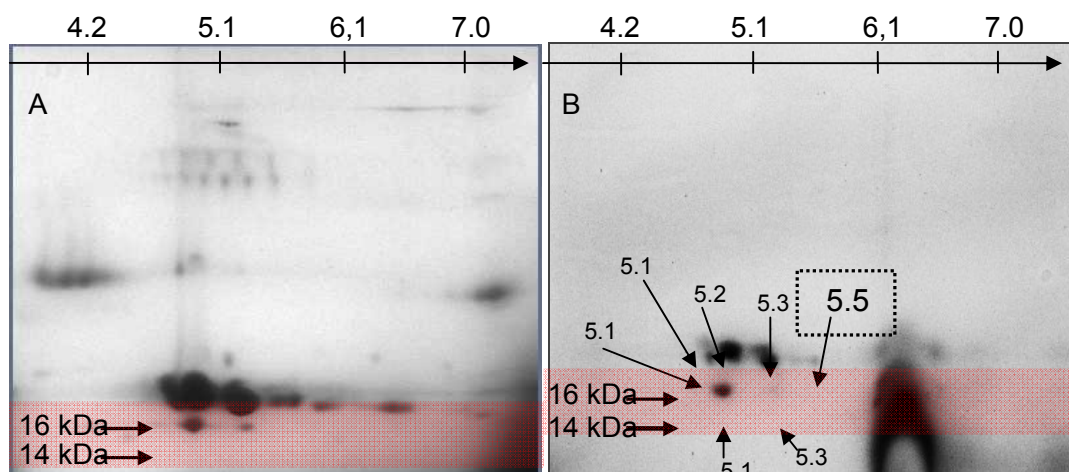


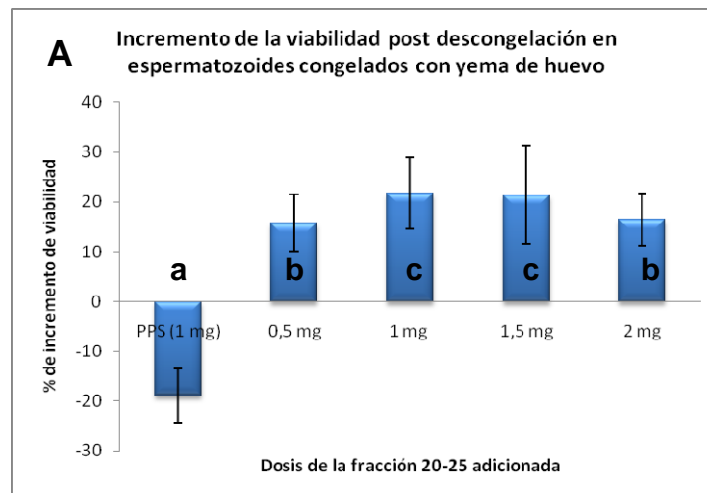
Figura 25. Electroforesis bidimensional de plasma seminal de Sanmartinero con rango de separación de pH 4 a 7. A. Gel bidimensional de plasma seminal completo. B. Gel bidimensional de la fracción 20, se señalan los pesos moleculares aproximados y los

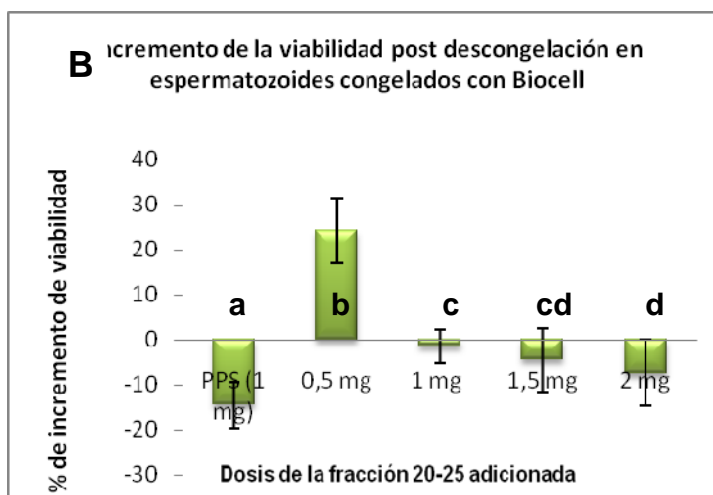
puntos isoeléctricos de los 7 puntos presentes en las bandas de 14 y 16 kDa. Se resalta el punto con pI 5.5, de interés por su correlación con la viabilidad espermática (Ver capítulo anterior).

Adición de las fracciones 20 a 25 obtenidas por cromatografía de exclusión

En éste trabajo se uso la fracción cromatográfica que contiene un punto de proteína de peso molecular 16.20 kDa y punto isoeléctrico 5.5, del cual se sabe, tiene una correlación estadística ($r=0.64$ $p<0.001$) con la viabilidad espermática en semen de toros Sanmartinero y cuyas características se presentan similares a las reportadas para las proteínas BSP.

Cuando se evaluó el efecto de la adición de la fracción proteica en diferentes dosis (0.5, 1, 1.5 y 2 mg/ml) en espermatozoides descongelados (previamente criopreservados en los medios descritos anteriormente) e incubados por una hora a 37 °C, se logró determinar un aumento de la viabilidad con respecto a las muestras control (que no contienen proteínas) incubadas con MHTF durante 1 hora a 37°C. Sin embargo, el efecto de las diferentes dosis depende del medio de congelación que se utilice dado que se evidenciaron diferencias en el aumento de viabilidad cuando se usaron los dos diferentes medios de congelación. En los espermatozoides descongelados de los dos medios de criopreservación, con yema de huevo y Biocell® comercial, se presenta una importante disminución de la viabilidad cuando éstos son incubados con el paquete completo de proteínas de plasma seminal (figura 26).





*Medias con letra diferente presentan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Figura 26. Incremento porcentual de la viabilidad post-descongelación de 1 millón de espermatozoides criopreservados con: A) yema de huevo y B) Biocell® comercial. Los espermatozoides se descongelaron e incubaron con diferentes concentraciones de proteínas contenidas en la fracción 20-25 durante 1 hora a 37 °C.

La viabilidad espermática de los espermatozoides sin proteínas fue 39.8 ± 8.2 %. Al incubar (spz) descongelados (medio de criopreservación con yema de huevo), las dosis de la fracción comprendidas entre 1.0 y 1.5 mg presentaron un incremento en el porcentaje de viabilidad de $22.0 \pm 6.5\%$ con respecto a la muestra control. Las dosis de 0.5 y 2.0 mg/ 10^6 spz, aunque presentaron un incremento de la viabilidad, parecen no tener la misma efectividad.

De otro lado, la incubación de las muestras de espermatozoides descongeladas (medio de congelación comercial Biocell®) evidenciaron resultados diferentes, dado que la concentración de proteínas provenientes de la fracción 20-25, óptima para obtener un aumento porcentual en la viabilidad post-descongelación de $25.2 \pm 5.3\%$ fue de 0.5 mg/ 10^6 spz. Concentraciones mayores de proteína parecen tener un efecto deletéreo similar al presentado cuando se adiciona 1 mg de proteínas totales de plasma seminal.

De otro lado, la adición del paquete completo de proteínas del plasma seminal parece disminuir drásticamente la viabilidad post-descongelación de las muestras incubadas durante 1 hora.

En el presente trabajo también se evalúa la reversión entendida como la capacidad de las proteínas de regenerar la membrana espermática, teniendo en cuenta el daño generado desde la colección de la muestra seminal. El trabajo de Barrios planteó una fórmula para evaluar la reversión del daño teniendo en cuenta la relación entre las células recuperadas (la diferencia entre la viabilidad de las células después de 1 hora de incubación con y sin proteínas) y las teóricamente

recuperables (la diferencia entre la viabilidad de la muestra fresca y la viabilidad de las células después de 1 hora de incubación sin proteínas. De esta manera se contempla la viabilidad espermática antes de la congelación, teniendo en cuenta las diferencias de viabilidad espermática propia de los toros.

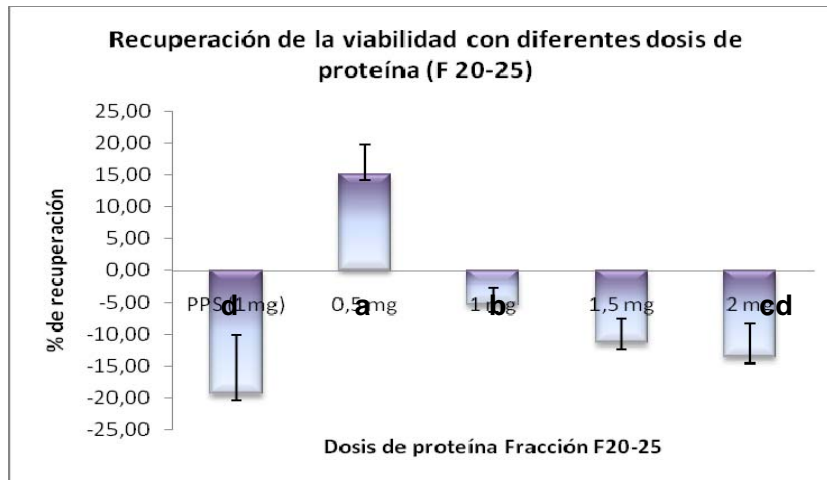
La viabilidad espermática de las muestras frescas, medida a través de la tinción carboxifluoresceína-ioduro de propidio, fue en promedio $70.7 \pm 6.1\%$, muy superior a la viabilidad post-descongelación promedio de todas las pajillas la cual fue de $28.0 \pm 5.2\%$. El marcado descenso (alrededor del 40%), con respecto a la viabilidad de las muestras frescas, evidencia el daño causado por la criopreservación. La adición de la fracción 20-25 usando $0.5 \text{ mg}/10^6$ espermatozoides, cuando el semen se congeló con Bioxcell[®], presentó la mayor viabilidad en comparación con las demás dosis (tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de viabilidad espermática en semen fresco y descongelado con medio Bioxcell en incubado con diferentes dosis de la fracción 20-25 post-descongelación.

Semen fresco	Viabilidad (%)					
	Control	Proteínas plasma seminal	0,5 mg/10 ⁶ spz	1 mg/10 ⁶ spz	1,5 mg/10 ⁶ spz	2 mg/10 ⁶ spz
70,70 ±6,13	27,91 ^b ±5,16	19,94 ^e ±5,66	32,32^a ±6,55	25,73 ^{bc} ±6,32	23,51 ^{cd} ±6,38	22,20 ^{de} ±6,69

*Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

Cuando el análisis contempla el descenso de viabilidad post descongelación desde la muestra fresca, a través de la fórmula $[(Vp60-Vc60)/(Vw-Vc60)] \times 100$, se logra evidenciar que el porcentaje de recuperación de la viabilidad es de 15,23%, y es el único tratamiento que tiene un claro efecto de reversión del daño en la viabilidad, comparado con el plasma seminal completo y las dosis comprendidas entre 1.0 y 2.0 mg/10⁶ espermatozoides (figura 27). Estas dosis, especialmente la más alta, además de no presentar efecto de reversión del daño en los valores de viabilidad espermática, parecen tener un efecto deletéreo al disminuir la viabilidad post congelación.



*Medias con letra diferente presentan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Figura 27. Porcentaje de recuperación de la viabilidad de la membrana espermática en espermatozoides descongelados e incubados con la fracción F20-25 durante 1 hora a 37 C°. La viabilidad se midió como el porcentaje de células con membrana íntegra sometidas a tinción de carboxifluoresceína-ioduro de propidio y el porcentaje de recuperación se evaluó mediante la fórmula $[(Vp60-Vc60)/(Vw-Vc60)] \times 100$, donde Vp60 es la viabilidad de la muestra incubada 60 minutos con proteína adicionada; Vc60 es la viabilidad de la muestra incubada 60 minutos sin proteínas; y Vw es la viabilidad de la muestra fresca.

Viabilidad post descongelación y efecto de recuperación de la viabilidad en toros de razas Sanmartinero y Cebú.

Cuando se evaluó las diferencias en el descenso de viabilidad post descongelación entre las razas Sanmartinero y Cebú, se logró determinar que las muestras de Sanmartinero descienden de $70,6 \pm 7.4\%$ en semen fresco a $29,8 \pm 5.3\%$ post descongelación (57,68%). Por su parte en el semen de toros Cebú, la viabilidad desciende de $70,8 \pm 4.6\%$ a $26,75 \pm 4.3\%$ (62.21%), no existen diferencias significativas en la viabilidad post descongelación entre las dos razas. Cuando se comparan las viabilidades post descongelación de las muestras incubadas con 0.5 mg de proteína semipurificada de plasma seminal (fracción 20-25), de cada raza, la viabilidad de los espermatozoides de la raza Sanmartinero se incrementa hasta llegar en promedio a 38%, (aumento del 23%) mientras que en el semen de la raza cebú no hay un efecto significativo (figura 28).

En la evaluación del porcentaje de reversión teniendo en cuenta la fórmula $[(Vp60-Vc60)/(Vw-Vc60)] \times 100$, el porcentaje de reversión del daño causado en la membrana de espermatozoides de Sanmartinero, al adicionar 0.5 mg de la fracción 20-25, fue de 18.03% lo que representa una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al porcentaje de reversión en espermatozoides de Cebú, que fue 6,8% (figura 29).

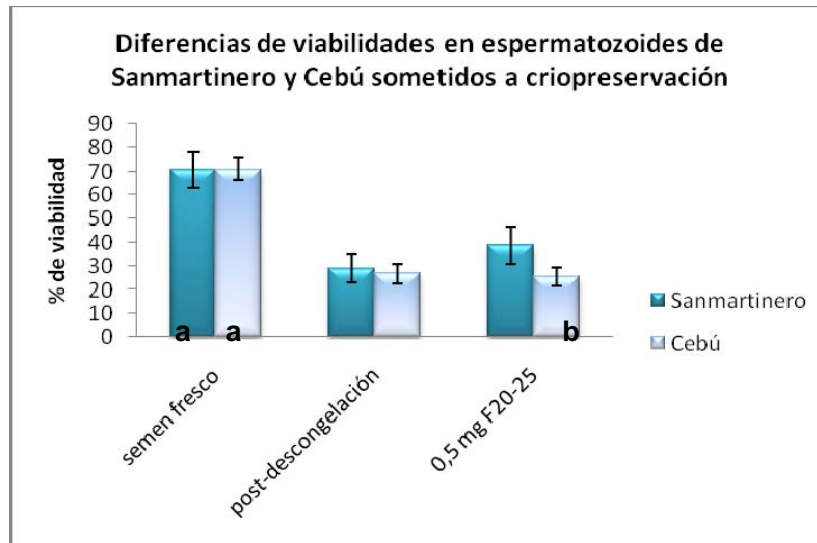
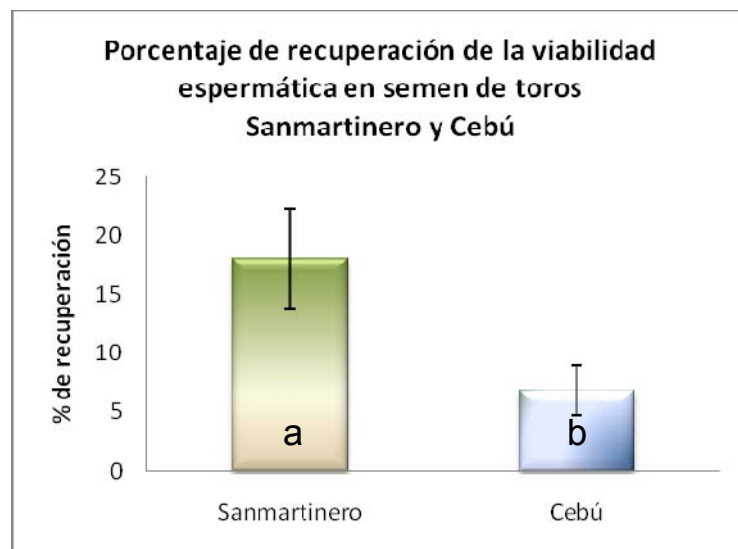


Figura 28. Porcentajes de viabilidad espermática en semen de toros de las razas Sanmartinero y Cebú en semen fresco, descongelado e incubado con una dosis de fracción 20-25 de 0.5 mg/10⁶ espermatozoides. Se aprecia diferencia significativa (p<0.05) solo en el tratamiento con la fracción 20-25 en espermatozoides de Sanmartinero.



*Medias con letra diferente presentan diferencias significativas (p<0.05)

Figura 29. Porcentajes de recuperación de la viabilidad espermática en semen de toros de las razas Sanmartinero y Cebú, luego de ser incubados con 0.5 mg de proteína de la fracción 20-25. Se aprecia diferencia significativa (p<0.05) en el porcentaje de recuperación de la viabilidad de espermatozoides de Sanmartinero con respecto a los espermatozoides de toros Cebú.

Dado lo anterior, se logró evidenciar que la adición de un grupo de proteínas de bajo peso molecular solo tiene efecto de recuperación del daño en la membrana espermática, ocasionado por criopreservación, cuando se adiciona en semen de toros Sanmartinero. Aunque si hubo un efecto en semen de toros cebú, no es suficiente para considerarlo significativo cuando se compara con la viabilidad post descongelación.

Discusión

Separación Cromatográfica de proteínas del plasma seminal

La separación de proteínas de plasma seminal evidenció que la fracción cromatografica obtenida mediante exclusión por tamaño, que contenía proteínas de pesos moleculares semejantes a las proteínas BSP y que presentó correlación con la viabilidad espermática, se encontró entre los tubos 20 y 25, colectados a razón de 0.5ml/min. Los cromatogramas obtenidos demostraron que las fracciones comprendidas en los tubos 20-25, presentan la mayor cantidad de proteínas. Cuando se sometieron las fracciones a separaciones electroforéticas unidimensionales, se encontró que las fracciones 20-25 contenían dos bandas de 14 y 16 kDa, las cuales coinciden con el rango de pesos moleculares dentro del cual están las proteínas BSP. Dado que solo son dos bandas, la cantidad relativa de cada banda y el area de los picos cromatográficos indican que estas bandas corresponden a las proteínas más abundantes dentro del plasma seminal analizado. En éste sentido, otras investigaciones han evidenciado que las proteínas BSP A1/A2, también llamadas PDC-109, comprenden el grupo de proteínas más abundantes en el plasma seminal bovino (Manjunath, 1993; Therien, 1997; Therien y Manjunath ., 1999; Swamy, 2004; Moura, 2006). Este tipo de proteínas representa entre 20 y 40 mg/ml en el plasma seminal, lo cual constituye entre el 30 y el 60% de las proteínas totales. Cuando se usaron concentrados de 170 mg/ml de proteína total, se logró obtener entre 90 y 113 mg/ml a partir de los concentrados de las fracciones 20 a 25, lo que representa cerca del 67% de la muestra de plasma empleada.

La electroforésis en una dimensión comprueba la separación de la banda de proteínas más gruesa en las fracciones 2 a 25. En 1996, Calvete logró desarrollar una estrategia para separar el grupo de proteínas más representativo del plasma seminal, mediante el uso de cromatografía clásica no denaturante. El trabajo en mención se encaminó hacia la semi-purificación de proteínas como las BSP A1/A2, BSP de 30 kDa, proteínas ácidas del plasma seminal (aSFP) e inhibidor tisular de metaloproteínasa (TIMP-2). A través de columnas de Sephacril S-50, lograron obtener 2 picos representativos en un cromatograma similar al obtenido en el presente trabajo (Anexo 10).

En la electroforésis realizada por Calvete se puede evidenciar que las fracciones colectadas con las bandas de 16 kDa se encuentran desde la fracción 15 en adelante, similar a lo obtenido en la presente investigación.

De otro lado, Barrios en el 2000 logró separar fracciones similares a través de columnas de sefacril S-100 a partir de plasma seminal de carnero. En las fracciones que separaron se logró obtener dos bandas de proteína de 14 y 20 en lo que denominaron fracción 6 (Anexo 11). Estas dos bandas representaron cerca del 70 % de las proteínas totales del plasma seminal ovino y la fracción 6 se seleccionó para ser usada en pruebas de reversión de daño en membrana en espermatozoides sometidos a choque térmico por bajas temperaturas.

La banda de 14 kDa coincide con el peso molecular de las proteínas PDC 109 y aunque dicha banda puede contener más proteínas de peso molecular igual o cercano, es muy posible que, tanto la fracción 6 obtenida por Barrios, como el concentrado de fracciones 20 a 25 obtenido en la presente investigación, contengan cierta cantidad de estas proteínas. Por ésta razón en este trabajo se decidió usar el concentrado de las fracciones 20 a 25 evaluar el posible efecto de reversión del daño Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú criopreservación.

Adición de las proteínas de plasma seminal contenidas en las fracciones 20-25, a espermatozoides descongelados

Algunas proteínas del plasma seminal se han propuesto como aditivos para mejorar la viabilidad del semen criopreservado en semen ovino y bovino. Las proteínas BSP han sido separadas y usadas como agentes protectores del espermatozoide contra capacitación prematura y estrés oxidativo. El uso éstas como aditivos protectores en semen bovino se basa tanto en su cantidad como en su estructura y función. En éste trabajo se uso la fracción cromatográfica que contiene un punto de proteína de peso molecular 16.20 kDa y punto isoeléctrico 5.5, el cual presentó una correlación estadística importante ($r=0.64$ $p<0.001$) con la viabilidad espermática en semen de toros Sanmartinero y cuyas características se presentan similares a las reportadas para las proteínas BSP (Moura, 2006). Se logró evidenciar que, cuando se evaluán todos los toros sin discriminación de raza, existe un aumento en la viabilidad postescongelación de alrededor del 20% cuando se usa entre 1 y 1.5 mg por cada millón de espermatozoides descongelados. Esta dosis es adecuada cuando se usa medio citrato-fructosa incluyendo yema de huevo. Sin embargo, hay un efecto de aumento de viabilidad similar con una dosis de las fracciones 20-25 menor (0.5 mg/millón de espermatozoides) cuando se usa medio comercial Bioxcell para la congelación. Esto último indica la posibilidad de que el medio comercial contenga algún aditivo adicional que pueda enmascarar el efecto de las proteínas provenientes de las fracciones 20-25.

De otro lado, la adición de las proteínas del plasma seminal sin ser sometidas a separaciones cromatográficas parece tener el efecto contrario, disminuyendo la viabilidad del semen luego de ser descongelado. Esto concuerda con lo reportado en 1983 por Baas, quien determinó que la viabilidad, así como la motilidad, de

espermatozoides incubados con plasma seminal completo pudo regenerarse solo cuando el plasma seminal se sometió a ultrafiltración y se usó la parte del filtrado que contenía proteínas menores a 50 kDa. En el mismo trabajo se logró concluir que el plasma seminal completo en exceso tiene un efecto nocivo para la viabilidad espermática y que la presencia de las proteínas de bajo peso molecular tiene un factor estimulante de la viabilidad en semen bovino.

De otro lado, en el trabajo de Barrios del 2000, la adición del paquete completo de proteínas de plasma seminal, aunque no disminuyó la viabilidad post-descongelación, tuvo un efecto menor al presentado por la fracción 6 (con proteínas de 14 y 20 kDa). Sin embargo, en tal investigación se logró comprobar que la adición de fracciones de plasma seminal que contenían proteínas con pesos moleculares superiores a 60 kDa, no tenían mayor efecto en la recuperación de la viabilidad del semen ovino sometido a choque térmico, lo que demuestra que son las proteínas de bajo peso molecular, presentes en el plasma seminal, las que intervienen en la reestructuración de la membrana del espermatozoides sometidos a los efectos deletéreos de la criopreservación. Jobim, en el 2006, evaluó los perfiles electroforéticos de proteínas del plasma seminal de bajo peso molecular y los comparó con semen de toros con alta y baja congelabilidad. Los resultados demostraron que ciertos puntos de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 11 y 16 kDa y con puntos isoeléctricos comprendidos entre 4.0 y 5.3, se presentaron con mayor frecuencia y cantidad en plasma seminal de toros con alta congelabilidad. Mientras que, un punto de proteína con peso molecular de 26 kDa y punto isoeléctrico entre 6.0 y 6.5 fue significativamente más abundante ($p < 0.05$) en los perfiles de plasma seminal de toros con baja congelabilidad (Anexo 12).

Aunque las proteínas de bajo peso molecular parecen tener un efecto de recuperación en espermatozoides post-descongelación, se ha reportado que también previenen efectos deletéreos cuando se adicionan antes de ser sometidos a procesos de criopreservación. Los trabajos adelantados con semen ovino han demostrado que proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú a una temperatura de espermatozoides hasta 5°C durante 1 hora, aumentan la viabilidad del semen de 26 % a 34%, preservando la integridad de la membrana espermática. (Perez, 2001). De esta manera, los trabajos con proteínas de plasma seminal ovino han logrado demostrar el efecto protector y de reversión en el espermatozoide contra los daños generados por bajas temperaturas.

Cuando en el análisis de los datos se tiene en cuenta el descenso de la viabilidad desde la toma de la muestra incluyendo la fórmula del porcentaje de recuperación adaptada de Barrios en el 2000, se logra apreciar una recuperación de la viabilidad post descongelación de alrededor de 15% cuando se usa 0,5 mg/ millón de espermatozoides. Dosis más altas parecen no tener mayor efecto e incluso algunas tienen un marcado efecto deletéreo en la viabilidad post descongelación.

El trabajo de reversión reportado por Barrios para semen ovino indica que la dosis mínima para tener un efecto de reversión significativo ($p < 0.05$), corresponde a $0.5 \text{ mg}/10^6$ espermatozoides de la denominada "Fracción 6". Sin embargo, dosis superiores hasta $2.5 \text{ mg}/10^6$ espermatozoides, de la misma fracción no presentan el mismo efecto negativo en espermatozoides ovinos. Aunque dicha investigación evalúa el efecto de las proteínas en células sometidas a choque térmico, no incluye ningún protocolo de criopreservación. Es posible que el efecto negativo evidenciado en la presente investigación sea debido a una interferencia del medio comercial empleado para la congelación de las pajillas.

Se ha descrito que el proceso de congelación-descongelación tiene un efecto negativo en la integridad de la membrana espermática. Esta membrana es fundamental para el metabolismo espermático y para que el espermatozoide lleve a cabo varios procesos involucrados en la fecundación (Rota, 2000; Vera, 2003). Estudios realizados en la Universidad de Zulia (Venezuela) determinaron que el proceso de congelación-descongelación causó un marcado efecto deletéreo sobre la integridad estructural y funcional de las membranas plasmáticas y acrosómicas en los espermatozoides bovinos criopreservados. Sin embargo, se pudo demostrar que los espermatozoides resisten de manera diferente dichos efectos y que el daño no es localizado, es decir, puede ocurrir indistintamente en la membrana plasmática o acrosómica (Rubio, 2009).

Se ha demostrado que el plasma seminal puede suprimir y revertir la capacitación, es decir, decapacitar espermatozoides previamente capacitados (Cross, 1993). Lo anterior puede deberse al efecto de adsorción que presentan proteínas específicas. Proteínas como las BSP (posiblemente contenidas en la fracción 20-25 adicionada en éste trabajo), han probado que poseen un efecto de adsorción a la membrana plasmática por su interacción con los fosfolípidos de la misma (Manjunath, 2009; Manjunath 1997; Manjunath, 1994; Souza, 2008; Moura, 2007; Swamy, 2004) lo que permite explicar, en parte el efecto de recuperación de la viabilidad evidenciada por la fracción 20-25 en dosis de $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$. El efecto decapacitante de éstas proteínas se encuentra asociado a su estructura y cantidad. Las proteínas BSP son las más abundantes en el plasma seminal bovino (Manjunath, 2009; Moura, 2007; Manjunath 1997) es posible que dosis más altas lleven a capacitar al espermatozoide en lugar de inhibir la capacitación, lo que podría explicar el efecto negativo evidenciado cuando se adicionaron dosis de la fracción 20-25 superiores a $0.5 \text{ mg}/10^6$ espermatozoides. De ésta manera, aunque sí existe recuperación de la membrana plasmática al adicionar proteínas semi-purificadas contenidas en la fracción 20-25 (pesos moleculares entre 14 y 16 kDa y puntos isoeléctricos entre 5.0 y 5.5), el efecto de recuperación post descongelación depende también de la cantidad adicionada y del medio de congelación empleado.

El medio Bioxcell[®], (IMV Technologies, Francia), es un criopreservante comercial fabricado a base de lecitina de soya. La lecitina es el nombre genérico que se le da a la fosfatidilcolina, un fosfolípido compuesto por colina, ácido palmítico, ácido

esteárico y ácidos grasos polinsaturados de 18 carbonos como oleico, linoléico y linolénico, presente en las bicapas lipídicas de las membranas celulares.

En 1999, Manjunath logró establecer que las proteínas BSP A1/A2 interactúan con la colina de los fosfolípidos presentes en la membrana espermática durante la eyaculación. En dicho trabajo se incubaron espermatozoides epididimales con proteínas BSP purificadas para luego medir la pérdida de fosfolípidos de la membrana espermática, lo cual resultó en una pérdida del 34% de los fosfolípidos en espermatozoides incubados con las proteínas BSP. Dado que las primeras etapas de la capacitación espermática comprenden la composición lipídica de la membrana, se determinó que las proteínas BSP estimulan el flujo de fosfolípidos al mismo tiempo que remueven el colesterol de la membrana, dando paso a la capacitación. En este sentido, es posible que la fracción 20-25 (que posiblemente contiene proteínas BSP), adicionada a espermatozoides descongelados, (previamente criopreservados con el medio comercial), presente una fuerte interacción con el medio de criopreservación, regulada por la cantidad de proteína. Sin embargo el efecto deletéreo en la viabilidad espermática se presenta en dosis superiores a $0.5 \text{ mg}/10^6$ espermatozoides, lo cual indica la posibilidad de que dosis mayores desencadenen procesos de capacitación espermática, disminuyendo la cantidad de espermatozoides viables. Aunque es probable que en presencia de mayor cantidad de fosfolípidos se requiera de menor cantidad de proteína para tener un efecto de recuperación de la membrana espermática, ésta hipótesis requiere de más trabajos experimentales.

De otro lado, sucede lo contrario con el medio que contiene albúmina de huevo. Los mayores porcentajes de viabilidad post descongelación se lograron evidenciar con las dosis de 1.0 y $1.5 \text{ mg}/10^6$ espermatozoides, mayores a las necesarias para obtener porcentajes de recuperación positivos con el medio comercial. Es posible que esto se deba a la interacción de la albúmina presente en la yema de huevo con las proteínas adicionadas provenientes de la fracción 20-25. Se ha descrito que la albúmina presente en los fluidos oviductales facilita el flujo del colesterol (Singleton y Killian, 1983) promoviendo la capacitación espermática (Visconti y Kopf, 1998). La albúmina comprende cerca del 85% de las proteínas totales detectadas en los fluidos ampulares y oviductales (Souza, 2008), lo cual crea un ambiente en el que las modificaciones de la membrana espermática, que se presentan en la capacitación, se generan como consecuencia de las interacciones entre las proteínas del medio oviductal, plasma seminal y membrana espermática. Es posible que exista una interacción similar entre la albúmina del huevo y las proteínas adicionadas en la fracción 20-25, y probablemente por esto se hizo necesario adicionar mayor cantidad de proteínas de la fracción para lograr un aumento en la viabilidad post descongelación. En otras palabras, mayor cantidad de albúmina interacciona con más proteínas y se requiere de mayor cantidad para que éstas logren adherirse a la membrana del espermatozoide. Sin embargo se requiere de más experimentación para comprobar estos supuestos.

Viabilidad post descongelación y efecto de recuperación de la viabilidad en toros de razas Sanmartinero y Cebú

Se ha descrito que el porcentaje de espermatozoides con membrana espermática integra disminuye dramáticamente después de ser sometidos a procesos de congelación-descongelación. El efecto deletéreo se ha evidenciado en semen ovino (Ashworth y Harrison, 1994; Watson, 1995; Gunay, 2006) y bovino (Jobim, 2004; Rubio et al., 2009). En semen de toros se pudo comprobar que el descenso en los porcentajes de viabilidad espermática puede alcanzar del 40 al 60% cuando se evalúan los procesos comprendidos entre la colección de la muestra fresca y post-descongelación (Rubio, 2009).

Cuando se evaluó las diferencias en el descenso de viabilidad post descongelación entre las razas Sanmartinero y Cebú, se logró determinar que las muestras de Sanmartinero descienden de $70,6 \pm 7.4\%$ en semen fresco a $29,8 \pm 5.3\%$ post descongelación (57,68%). Por su parte en el semen de toros Cebú, la viabilidad desciende de $70,8 \pm 4.6\%$ a $26,75 \pm 4.3\%$ (62.21%), no existen diferencias significativas en la viabilidad post descongelación entre las dos razas. Dado lo anterior, se logró evidenciar que la adición de un grupo de proteínas de bajo peso molecular solo tiene efecto de recuperación del daño en la membrana espermática, ocasionado por criopreservación, cuando se adiciona en semen de toros Sanmartinero. Aunque si hubo un efecto en semen de toros cebú, no es suficiente para considerarlo significativo cuando se compara con la viabilidad post descongelación.

De otro lado, se estableció la presencia de un punto de proteína de 16.2 kDa y punto isoeléctrico 5,5, el cual coincide con las características de las proteínas BSP A1/A2 y su cantidad relativa presentó una correlación importante ($r=0.64$, $p<0,001$) con la viabilidad espermática en los perfiles electroforéticos de plasma seminal de Sanmartinero. Aunque este punto también se presentó en los perfiles electroforéticos de plasma seminal de toros Cebú, no tuvo correlación estadística con la viabilidad de esos toros. En ese sentido, es probable que la estructura y función de estas proteínas en plasma seminal de Cebú sea diferente con respecto a Sanmartinero, por lo cual el efecto de recuperación de la membrana plasmática no sea significativo. Lo anterior solo se podrá comprobar a través de experimentos que involucren técnicas de secuenciación para establecer homologías estructurales entre las proteínas de ambas razas, y de otro lado encamina las investigaciones hacia el uso de proteínas específicas para cada raza, que logren tener un efecto protector o de reversión adecuado para ejemplares *bos indicus* y *bos taurus* de forma independiente.

Conclusiones

El presente trabajo evidencia el efecto de la adición de fracciones de plasma seminal que contienen proteínas específicas, cuyas estructuras y funciones han sido estudiadas en investigaciones previas, y que han probado tener un importante potencial para revertir el efecto deletéreo ocasionado en la membrana espermática, por la criopreservación.

En algunos trabajos realizados con semen ovino y bovino, se ha logrado establecer que existe un importante efecto nocivo de la criopreservación en la membrana de los espermatozoides. Se ha determinado que el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra disminuye dramáticamente luego de ser sometidos a los procedimientos que comprenden la congelación y descongelación del semen. En éste trabajo se encontró que en el semen de toros Sanmartinero, la viabilidad disminuye 57,8 %, mientras en cebú disminuye 65,2%. En este sentido, el uso de proteínas específicas del plasma seminal puede recuperar la viabilidad de la membrana espermática. Dado que algunas de éstas proteínas tienen la capacidad de adherirse al espermatozoide y protegerlo contra daños ocasionados por choques térmicos, es posible que éste mismo efecto de adsorción sirva para recuperar la membrana espermatozoides que ha sido dañada en procesos de criopreservación.

En las fracciones cromatográficas 20 a 25, obtenidas en éste trabajo, se evidencio la presencia de 7 puntos de proteína de bajo peso molecular, cuyas características de peso molecular y punto isoeléctrico coinciden con las características de proteínas BSP A1, A2 y A3, reportadas en investigaciones previas. Estas proteínas han probado tener un efecto de adsorción a la membrana plasmática por su interacción con la fosfatidilcolina presente en la misma y se les atribuye en gran medida la regulación de la capacitación espermática.

Cuando se comparan las fracciones 20-25 del presente trabajo, con las obtenidas por cromatografía de exclusión en trabajos que evalúan la reversión del daño en la membrana de espermatozoides ovinos, se puede evidenciar que las fracciones que contienen las proteínas responsables de recuperar la viabilidad del semen post-descongelación, son las mismas fracciones que se lograron obtener en ésta investigación.

De otra parte, se logró determinar que el uso de las fracciones 20-25 en espermatozoides criopreservados, descongelados e incubados durante 1 hora a 37°C, aumentó los porcentajes de viabilidad espermática post descongelación cuando se utilizan medios de criopreservación de diferentes tipos. Sin embargo, la dosis mínima requerida para tener un efecto apreciable y significativo varía según el medio de congelación utilizado. Esto significa que tanto el aumento en la viabilidad post-descongelación, como la dosis de la fracción 20-25 necesaria para

evidenciar éste aumento, dependen del medio de criopreservación que se utilice, para el trabajo en concreto, Bioxcell comercial o medio citrato-fructosa con yema de huevo.

De otra parte, se logró evidenciar que cuando se usa el medio de congelación comercial, las viabilidades post-descongelación en muestras sometidas a dosis mayores a $0,5 \text{ mg por } 10^6$ espermatozoides, disminuyen de forma significativa, probablemente debido a interacciones entre las proteínas adicionadas y los suplementos del medio comercial.

Aunque existe efecto de reversión del daño causado en la membrana espermática por criopreservación, los espermatozoides de toros Sanmartinero son más susceptibles a mejorar los porcentajes de viabilidad cuando se incuban con proteínas de la fracción 20-25, en comparación con los espermatozoides de toros Cebú. Esto puede ser debido a que el descenso de la viabilidad post congelación que presenta el semen de toros Cebú es mayor que el de Sanmartinero.

En cuanto a la separación de las proteínas, la cromatografía de exclusión es efectiva en separaciones por sus diferencias en pesos moleculares. Sin embargo, muchas de las proteínas del plasma seminal bovino se caracterizan por tener bajos pesos moleculares, lo que indica que, en caso de que se requiera purificar una sola proteína del plasma seminal, se deben emplear estrategias de separación más específicas como cromatografía de afinidad o de intercambio iónico.

Recomendaciones

La presente investigación evidencio el efecto de reversión del daño causado por la criopreservación, que pueden tener proteínas específicas del plasma seminal en la viabilidad de espermatozoides bovinos descongelados. La adición de proteínas específicas puede convertirse en una alternativa para mejorar los resultados de viabilidad post descongelación y así mejorar la eficiencia de las dosis requeridas para inseminación artificial. En este sentido, posteriores investigaciones deberán ser dirigidas hacia probar el efecto protector de estas proteínas cuando se adicionan al medio de criopreservación. Esto último con el fin de establecer si el uso de pajillas que contienen estas proteínas específicas en pruebas de fertilidad *in vitro* puede tener también un efecto positivo en la eficiencia fecundante de semen criopreservado usado para inseminación artificial. De otro lado, el aislamiento y purificación de las proteínas en trabajos posteriores debería poder establecer si el efecto de reversión del daño en la membrana es causado por una sola proteína específica o por la interacción que puede existir entre un grupo de proteínas contenidas en una fracción separada por peso molecular. Para esto sería necesario establecer procedimientos cromatográficos más precisos, con el fin de separar todas las proteínas contenidas en la fracción obtenida por exclusión.

Por último, investigaciones posteriores que involucren animales de diferentes razas, deben contemplar el uso de proteínas específicas para cada raza con el fin de evaluar si el efecto de reversión y/o protección de las proteínas involucradas depende de alguna condición que pueda variar de una raza a otra.

Bibliografía

ASHWORTH, PJC., HARRISON, RAP., MILLER, NGA., PLUMMER, JM., WATSON, PF. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction and Fertility Development*. 1994, 6: 173–180

BAAS, JW., MOLAN, PC., SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1983, 68: 275–80

BARAJAS, D P., COY, P., VELÁSQUEZ, JG., RUEDA, F., HERRERA, R., CARDOZO, J.A. Proteínas del plasma seminal asociadas con la fertilidad de toros criollos Sanmartinero y Cebú en condiciones del trópico colombiano. *Memorias Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe SIRGELAC*. 2000: 153-154

BARRIOS, B., PEREZ-PE, R., GALLEGO, M. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 2000, 63: 1531-1537

CALVETE, J., VARELA, P., SANZ, L., ROMERO, A. A Procedure for the Large-Scale Isolation of Major Bovine Seminal Plasma Proteins. *Protein Expression and Purification*. 1996, 8: 48–56

CARDOZO, JA., FERNANDEZ-Juan, M., CEBRIAN-PEREZ, JA., MUIÑO-BLANCO, T. Identification of RSVP14 and RSVP20 Components by Two-dimensional Electrophoresis and Western-blotting. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006,10: 15-21

CROSS, N. L. Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. *Molecular Reproduction Development*. 1993, 35: 316–323

DESNOYERS, L., THERIEN, I., MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Molecular and Reproduction Development*. 1994: 425-435

EINSPANIER, T., KRAUSEB, I., CALVETE, J., KLOSTERMEYER, H., KARG, H. Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. *FEBBS letters*. 1994, 344: 61-64

FERNANDEZ, J., GALLEGO, M., BARRIOS, B., CEBRIAN-PEREZ, JA. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. *Reproduction*. 2006, 132: 588-595

FISER, PS., FAIRFULL, RW. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1989, 26: 64–69

FULLER, SJ., WOOD, MJ., WHITTINGHAM, DG., WATSON, PF. Cooling mouse sperm to 48C does not affect fertilization or embryonic development. *Journal of Reproduction and Fertility* .1994, 14. 8-14

GUNAY, U., DOGAN, I., NUR, Z. Influence of bull seminal plasma on post-thaw ram semen parameters and fertility. *Bulletin of Veterinary Institute Pulawy*. 2006, 50: 503-507

GWATHMEY, T. M. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*. 2003,69: 809-815

HARRISON, RA., VICKERS, S. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1990, 88: 342-353

IBRAHIM, M. Reproductive Tract Secretions and Bull Spermatozoa contain different clusterin Isoforms that cluster cells and inhibit Complement-induced Cytolysis. *Journal of andrology*. 1999, 26: 230-240

JOBIM, M., OBERST, E. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 2004, 61: 255–266

JOBIM, M., OBERST, E. BSP A1/A2 like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*. 2006, 63: 2053-2062

KILLIAN, J., CHAPMAN, D., ROGOWSKY, L. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. *Biology of Reproduction*. 1993, 49: 1202-1207

MANJUNATH, P., SAIRAM, M. Purification and Biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP A1, A2 y A3) in bovine seminal plasma. *Journal of Biochemistry*. 1987, 241: 685-692

MANJUNATH, P . Purific Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú plasma by affinity chromatography. *Biosciences of reproduction*. 1987, 7: 231-238

MANJUNATH, P., CHADONET, E. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1993, 49: 27-37

- MANJUNATH, P., THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids binding proteins in sperm membrane lipids modification that occurs during capacitation. *Journal of reproduction and immunology*. 2002, 53:109-119
- MANJUNATH, P., LEFEBVRE, J., WRIGHT, W. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biology of reproduction*. 2009, 80: p 394-397
- MORTARINO, M., TEDESHI, G., NEGRI, A. Two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. *Theriogenology* 1998, 19: 797-801
- MOURA, A., HASAN, K. Identification of proteins in accessory Sex Gland Fluid associated with fertility indexes of dairy bulls. *Journal of Andrology*. 2006, 27, No 2: 201-212
- MOURA, A., CHAPMAN, D., KILLIAN, A. comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*. 2007 vol 98
- NAUC, V., MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification seminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction*. 2000, 63:1058-66
- OLLERO, J. A., CEBRIAN-PEREZ. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing -thawing process. *Theriogenology*. 1998, 49: 547-555
- OLLERO, M., GARCÍA-LÓPEZ, N., CEBRIÁN-PÉREZ, JA., MUIÑO-BLANCO, T. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. *En Reproduction and Fertility Development*. 1997, vol , 9, p 381-390
- PEREZ PE, R., CEBRIAN-PEREZ, JA., MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma prevent cold shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*. 2001, 56: 425-435
- RONCOLETTA, M., DA SILVA, CARVALHO, M., Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Animal Reproduction Science*. 2006, 91: 77-87
- ROTA, A., PENZO, N; VICENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 2000, 53: 1415-1420

RUBIO, J, QUINTERO, A., GONZALES, D. Effect of Cryopreservation on Integrity of Plasmatic and Acrosomal Membrane of Bulls Sperm. Revista científica Universidad de Zulia. 2009, 29 N 4: 382-389

SANCHEZ, S. Interaction of PDC 109, the major secretory proteins from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane. Journal of Andrology. 2004, 25: 234-244

SINGLETON, C.L., KILLIAN, G.J., A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa *in vitro*. Journal of Andrology. 1983, 4: 150–156

SWAMY, M. interaction of bovine seminal plasma proteins with model membranes and sperm plasma membranes. Current Science. 2004, 87: 103-211

THERIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipids binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. Biology of Reproduction. 1999, 61:p 590-598

WALTON, A. Cold Shock of Spermatozoa. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 1957, 147, N. 929: 508-509



WATSON PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reproduction and Fertility Development. 1995, 7: 871–891

WATSON PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. En: Animal Reproduction Science. 2000, 60/61: 481–92

VERA, O. “Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos”. Capítulo XII. En: Reproducción Bovina. Ed. Ediciones Astro data SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. 2003

VISCONTI, P.E., KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. Biology of Reproduction. 1998, 59: 1–6

A Anexo: Formato de recolección de datos establecido por el Centro de Reproducción Animal Integral CRIA, para muestreos de semen bovino.

 	Centro de Reproducción Integral Animal -CRIA	CODIGO:
		VERSION:
		FECHA APROBACION:
NOMBRE DEL PROTOCOLO:		Página 1 de 1-
EVALUACION REPRODUCTIVA DEL TORO. Registro ICA. 2383 del 4 de Septiembre de 2003		
No Consecutivo:	Ciudad y Fecha: <i>Julio 14/09</i>	
Hacienda	Localización	Propietario
Especie <i>Bov</i>	Raza <i>S.M.</i>	Identificación del animal <i>06055</i>
Fecha de nacimiento	Registro Asociación	
EXAMEN FISICO DEL TORO		EXAMEN RECTAL
Condición Corporal (0-5)		Vesículas seminales Normal <input checked="" type="checkbox"/> Anormal
Perímetro Testicular (cms) <i>31</i>		Próstata y Ampulas Normal <input checked="" type="checkbox"/> Anormal
Aplomos Normal <input checked="" type="checkbox"/> Anormal		Anillo inguinal Normal <input checked="" type="checkbox"/> Anormal
Epidídimos Normal <input checked="" type="checkbox"/> Anormal		PRUEBAS COMPLEMENTARIAS
Pene Normal <input checked="" type="checkbox"/> Anormal		
Prepucio Normal <input checked="" type="checkbox"/> Anormal		
Observaciones:		
Forma de toma de la muestra seminal		
Vagina artificial	Electro-eyaculador	Otro
ESPERMOGRAMA		
Examen Macroscópico		Examen Microscópico
EYACULADO	1 2	PRE POST CONGEL 1 2
Volumen de eyaculado (ml) <i>3</i>		EYACULADO 1 2 1 2
Color <i>bl.</i>		Motilidad masal (%) <i>90</i>
Aspecto <i>teclado</i>		Motilidad Individual (%) <i>85</i>
pH		Concentración (x10 ⁶ /ml) <i>1,48x10⁶</i>
Otros		Viabilidad (%)
		Anormalidades primarias (%)
		Anormalidades secundarias (%)
CONGELACION		
Diluyente	Procedimiento:	
Observaciones <i>1.88 Vorticula fecal en muestra: hiperfosfata</i>		

B. Anexo: Protocolo estándar establecido por la Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria CORPOICA para uso de nanodrop en la medición de proteínas

1. OBJETIVO

Cuantificar la cantidad de proteínas en soluciones acuosas.

2. DESCRIPCIÓN

DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD	RESPONSABLE	OBSERVACIONES
Agitar las muestras durante 1 s utilizando el vortex.	Analista de calidad	
Abrir el programa ND-1000 V3.3.0, y seleccionar del menú principal el tipo de muestra a medir	Analista de calidad	Seleccione la opción BSA para medir con el coeficiente de la albúmina sérica bovina, a 280 nm
Limpiar inicialmente el pedestal inferior del con 5 ul de H ₂ O destilada estéril y luego bajando el brazo sin hacer presión sobre el, para limpiar el pedestal superior.	Analista de calidad	
Secar con papel de arroz las dos superficies. No permitir que la punta de la micropipeta toque el pedestal y su superficie.	Analista de calidad	
Como patrón de referencia (blanco), utilizar 1 ul de H ₂ O destilada estéril o el buffer en el que este disuelto el material a cuantificar. Medir haciendo clic en el botón "Measure".	Analista de calidad	Si la muestra fu previamente diluida en buffer, el blanco a usar deberá ser el mismo buffer
Secar con papel de arroz.	Analista de calidad	
Colocar 1 ul de la muestra y medir como en el paso	Analista de calidad	
Hacer un lavado con H ₂ O destilada estéril, como en el paso y secar con papel de arroz.	Analista de calidad	
Colocar la siguiente muestra y repetir los pasos, según el número de muestras.	Analista de calidad	
Una vez finalizada la medición de todas las muestras, hacer un lavado final del pedestal con 5 ul de etanol.	Analista de calidad	El etanol debe estar al 70% v/v
Guardar la información obtenida, haciendo clic en "Show Report". Seleccionar el tipo de reporte y guardar. La tabla de datos puede ser exportada al programa Microsoft Excel	Analista de calidad	

Anexo C. Tiras de Isoelectroenfoque IEF, de 7 cm y rango de pI de 3 a 10



Anexo D. Protocolo estándar establecido por la Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria CORPOICA para elaboración de electroforesis bidimensional

EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Equipos

- Cámara de isoelectroenfoque IEF protean BIO RAD
- Cámara de electroforesis vertical miniprotean cell BIO RAD
- Fuente de poder para electroforesis
- Formador de geles en gradiente (opcional)
- Agitador magnético
- Plancha de calentamiento para tubos de polipropileno
- Shaker orbital
- Vortex

Materiales

- Vidrios separadores de 0.75 mm o 1 mm (según requerimiento)
- Bandejas de rehidratación
- Bandejas para isoelectroenfoque
- Pinzas
- Micropipetas (1-10, 10-100 y 100-1000 ul)
- Probeta de 1000 ml
- Espátula para extracción de geles
- Tubos de polipropileno de 1 ml
- Beaker

Reactivos

- Acrilamida 30% p/v
- Aceite mineral grado electroforesis
- Ácido acético glacial
- Agua destilada desionizada
- Azul de coomasie
- Bisacrilamida
- Buffer lower pH 8.8
- Buffer upper pH 6.8
- Buffer de rehidratación
- Buffer 5x
- Buffer 1x
- Buffer de equilibrio I con Iodoacetamida
- Buffer de equilibrio II con Ditiotretitol
- Isopropanol
- Metanol
- Persulfato de amonio
- TEMED
- Tiras para isoelectroenfoque BIO RAD

METODOLOGÍA

Electroforesis de proteínas por isoelectroenfoque IEF

Rehidratación de las tiras

- a. Retirar el vial que contiene el buffer de rehidratación (125 μ l para tiras de 7 cm, o 185 μ l para tiras de 11 cm) del congelador y agregar la cantidad de muestra adecuada y el marcador de peso molecular y punto isoeléctrico. (Marcadores 2D).
- b. Extender la mezcla a lo largo de uno de los canales de la bandeja de rehidratación, hasta un centímetro de cada final del canal. Se debe tener cuidado de que no se formen burbujas al depositar la mezcla, pues puede interferir con la distribución de la muestra en la tira.
- c. Retire con cuidado ayudándose con pinzas la cubierta protectora de la tira
- d. Coloque la tira sobre la mezcla, ayúdese con una pinza. La cara del gel debe mirar la mezcla, de tal forma que la parte escrita (El signo + y el rango de pH) de la tira debe quedar visible. Tenga cuidado de no colocar muestra sobre la parte plástica de la tira pues en ese lado no se absorbe la muestra. Si en algún momento se forman burbujas bajo la tira, muévala adelante y atrás hasta que la burbuja desaparezca, ayúdese con las pinzas.
- e. Cubra la tira con 2 a 3 ml de aceite mineral para prevenir la evaporación. Adicione el aceite lentamente, colocándolo sobre la parte plástica de la tira y a lo largo de esta.
- f. Coloque la tapa a la bandeja de rehidratación y déjela por 11 – 16 horas o toda la noche sobre una superficie plana.

Isoelectroenfoque

- a. Cubrir la terminal de cada electrodo de la bandeja de enfoque con un papel especial para el caso. Adicionar 8 μ l de agua desionizada sobre cada papel, reajuste la posición de estos si es necesario.
- b. Remover la cubierta de la bandeja de rehidratación y con las pinzas retire la tira hidratada.
- c. Colocar las tiras en forma vertical sobre papel filtro seco por 7 a 8 segundos para drenar el aceite.
- d. Transferir la tira al correspondiente canal de la bandeja de enfoque (mantenga la cara del gel mirando hacia abajo). Recuerde colocar la tira en la polaridad correcta durante la transferencia. El signo "+" de la tira debe coincidir con su igual en la bandeja de enfoque.
- e. Cubrir cada tira con dos a tres ml de aceite mineral. Chequear que no hayan quedado burbujas debajo de la tira, si esto ocurre remueva la tira hasta que la burbuja desaparezca.
- f. Tape la bandeja de enfoque.
- g. Programar el aparato de enfoque (PROTEAN IEF) con el protocolo adecuado. Para todas las tiras la temperatura por defecto es 20° C y un máximo de corriente de 50 μ A/Tira. Presione Start para iniciar.

Programación del PROTEAN IEF Cell

Las condiciones de enfoque varían con la composición y complejidad de la muestra y el rango de pH de las tiras (IPG) de gradiente inmobilizado de pH.

Para tiras de pH 3-10, 4-7 y 5-8. Longitud de la tira 7 cm

Equilibrio de las tiras

Después de finalizado el proceso de iso-electroenfoque y antes de ejecutar la segunda dimensión deben realizarse los siguientes pasos:

- a. Saque la tira de la bandeja de enfoque y remueva el aceite.

Nota: Si las tiras fueron congeladas a -70°C , es conveniente que el tiempo de descongelación no sea mayor de 15 minutos, este tiempo puede estar entre 10 y 15 minutos. Es conveniente que el tiempo de descongelación no vaya más allá de 15 a 20 minutos por que la difusión de las proteínas puede originar la reducción en la resolución de los puntos de proteína.

b. Deposite 2.5 ml de buffer de equilibrio (I) (con DTT) (para el caso de tiras de 7 cm) en el canal de la bandeja de equilibrio.

c. Colocar la bandeja de equilibrio en el balancín durante 10 minutos a una velocidad que no ocasione la salida del buffer.

d. Al cabo de los 10 minutos descartar el buffer cuidadosamente mediante decantación. Este procedimiento se realiza inclinando la bandeja por la parte cuadrada hasta que quede en posición vertical. Tenga cuidado al iniciar este procedimiento para que las tiras no se salgan de la bandeja, cuando se haya decantado gran parte del líquido, sacuda cuidadosamente dos veces la bandeja para eliminar las últimas gotas del buffer.

e. Depositar 2.5 ml de buffer de equilibrio (II) (con Iodoacetamida) (para el caso de tiras de 7 cm) en el canal de la bandeja de equilibrio. Colocar nuevamente la bandeja en el balancín por 10 minutos.

f. Durante la incubación de la tira con el buffer II, lleve la agarosa (con azul de bromofenol al 2% - 3 mg/10ml) al horno microondas por 45 o 60 segundos, o hasta que liquifique. El tiempo depende del equipo de microondas. En ocasiones es conveniente parar el microondas, sacar la agarosa y agitarla, volver a introducirla en el equipo por 15 segundos más y agitarla de nuevo hasta alcanzar la liquefacción.

g. Al finalizar la incubación con el buffer II, descarte el buffer cuidadosamente tal como se procedió con el primer buffer.

Segunda dimensión de la electroforesis

a. Llenar un tubo de la misma longitud de la tira con tampón de corrida o tampón de electroforesis (Tampón de cubetas 1X). Con una pipeta Pasteur.

b. Introducir la tira brevemente en el tampón de corrida; repetir el proceso con las tiras restantes.

c. Colocar la tira sobre la lamina de vidrio grande, la cara del gel debe mirar hacia usted. Para ello coloque los vidrios sobre la superficie de la mesa

d. Adicionar con una pipeta Pasteur una cantidad de agarosa con azul de bromofenol suficiente para completar el espacio entre las dos láminas de vidrio y empujar la tira hasta que haga contacto con el gel separador, asegúrese de que no se formen burbujas entre la tira y el gel separador. Tener cuidado de empujar la tira del lado donde se encuentra la parte plástica y no del lado de la matriz del gel.

e. Permitir que se solidifique la agarosa, antes de continuar con el procedimiento.

f. Ensamblar el gel o los geles en el aparato para tal fin y proceda en idéntica forma como se realiza la SDS - PAGE.

Ensamblado de la cámara vertical

a. Disponga los vidrios separadores de forma vertical, de manera que quede el espacio requerido para la preparación del gel. Verifique que estén colocados de manera correcta sin diferencias entre ellos o alrededor.

b. Inserte los vidrios juntos en el soporte desde la parte de arriba, colocándolos en una superficie plana horizontal sin dejar espacios entre ellos o desviaciones con respecto a los soportes. Si al servir el gel hay escape de poliacrilamida es porque los vidrios están colocados incorrectamente.

c. Coloque los soportes con los vidrios sobre la espuma que está en el dispositivo de acrílico, presionando con el gancho la parte de arriba

d. Proceda con la preparación del gel de poliacrilamida según protocolo. Deposite la acrilamida en el espacio que queda entre los vidrios separadores hasta que polimerice.

Preparación del gel de poliacrilamida.

a. Tome dos Beaker y adicione acrilamida al 30 %. Adicione buffer lower pH 8.8, agua destilada desionizada, TEMED, y persulfato de amonio (según las concentraciones que requiera), para un volumen final de 7 ml en caso de que el gel sea de 1 mm de espesor. En caso de que se requiera trabajar con gradiente de concentraciones de acrilamida, utilice el formador de gradiente, depositando el gel de mayor concentración en el primer pozo de izquierda a derecha y el de menor concentración en el segundo pozo.

b. Una vez depositado el gel en el formador de gradiente, sirva el gel en el orificio que esta en los vidrios dispuestos en el soporte. Llene hasta 5 mm antes del borde del vidrio separador

c. Adicione isopropanol encima del gel servido

6.3 Montaje de la camara

Nota: asegúrese de que los soportes, el marco y los vidrios separadores estén limpios y secos antes de ensamblar la cámara. Los residuos de polvo pueden alterar la presión de la cámara durante el uso y ocasionar errores en el ensayo. El polvo debe ser removido antes de cada uso mediante limpieza con alcohol etílico.

a. Una vez polimerizado, saque el gel del soporte y colóquelo en el marco. Si se requiere de un solo gel, utilice el reemplazo de policarbonato en el lado contrario del marco.

b. Introduzca el marco con los geles en la canastilla, presionando hacia abajo y cerrando la canastilla con los seguros de acrílico

c. Introduzca la canastilla conteniendo los geles en la cubeta y llene la parte interior de la canastilla con buffer de corrida, la parte exterior de la canastilla debe llenarse hasta cubrir la tercera parte del gel visto desde afuera.

d. Inserte la tapa de la cubeta haciendo coincidir los colores de los cables con los de los electrodos (negro-negro y rojo-rojo)

Manejo de la fuente de poder

La cámara cuenta con una fuente de poder que alcanza un voltaje máximo de 600 V con un límite de poder de 15 watts a una temperatura máxima de 50°C. Posee un panel digital desde el cual se puede controlar fácilmente el voltaje, el amperaje y el tiempo que dure la electroforesis según cada protocolo.

a) El botón de funciones cuenta con tres led que indican la función que se selecciona (voltaje, amperaje y tiempo. Orden descendente). Adicionalmente tiene un botón para elegir voltaje constante o amperaje constante.

c. El display indica cero (0) en cualquiera de las funciones y el led indica la función seleccionada mediante el botón de funciones

d. Ajuste las funciones usando el botón de aumento o disminución

e. Luego de seleccionar las condiciones adecuadas inicie la electroforesis con el botón "run"

f. La electroforesis terminará cuando acabe el tiempo. Si es necesario poner en pausa la electroforesis use el botón de "pausa"

g. Para detener definitivamente la electroforesis presione el botón "stop"

h. Al finalizar la electroforesis apague la fuente antes de desconectar la cubeta

Nota: no intente usar la fuente con alguna tapa de otra marca que no sea BIO RAD.

E. Anexo: Historial de Calidad seminal y congelaciones de los toros empleados como referencia en los mapas electroforéticos bidimensionales

BRAHMAN BLANCO

El Refugio Catalogado 984 – 3

El toro ingreso al Centro de Investigación La Libertad el 3 septiembre del año 2008, con un acta de entrega y una inclusión al sistema de amparo de la póliza contra todo riesgo del centro de investigación. El toro cuenta con su registro de pureza avalado por la Asociación Colombiana de Criadores de Ganado Cebú ASOCEBU No. 551751 expedida el 15 de septiembre del 2003, y del Certificado de Inscripción de Animales Donantes de Material Seminal No. 148-08 expedido por el ICA, con fecha 30 de Noviembre del 2008.

Previo al ingreso al Centro. en la Hacienda Santa Ana de donde procedía el toro, se habían realizado evaluaciones reproductivas bajo el convenio Ecopetrol – Corpoica en las que dio malos resultados, determinándose la aplicación de un tratamiento veterinario, permitiendo la congelación de material seminal para utilización en la misma Hacienda, luego de varias congelaciones se procedió a entregarlo al Centro de Reproducción Integral Animal – C.I. La Libertad Corpoica, con la finalidad de convertirse en Toro Residente donador de material seminal. A el toro se le continuo obteniendo material seminal, permaneciendo en las instalaciones del CRÍA hasta el día 13 de Noviembre del 2009, cuando fue retirado por dueño y reingresado el día 17 de Noviembre del 2009, retomando la póliza contra todo riesgo. Con la autorización y presencia del dueño le realizaron una cirugía para corrección de Acrobustitis el día 5 de marzo del 2010, al igual que un trabajo correctivo de pezuñas.

El toro tiene hijos que han sido utilizado como toretes reproductores, las novillas como pie de cría en varias ganaderías, luego del inicio de comercialización de pajillas crio preservadas se ha utilizado como reproductor en ganaderías productoras de ganadería pura Brahman de la región. En la actualidad el toro se encuentra en descanso sexual.

Pajillas Congeladas

Fecha Congelación	Numero Pajillas Congeladas	FACTURADO	Motilidad Pos descongelación %
20 Sept / 2007	173	Ecopetrol	60
13 Marzo / 2008	210	00003345	
20 Junio / 2008	637	00003489	50
10 Julio / 2008	438	00004191	40
12 Marzo / 2009	193	00004191	40
12 Mayo / 2009	170	00004191	35
14 Mayo / 2009	464	00004191	35
3 Junio / 2009	309	00004191	40
2 Julio / 2009	231	00004191	40
9 Julio / 2009	258	00004191	40
11 Agosto / 2009	154	00004191	40
26 Agosto / 2009	355	00004191	35
7 Septiemb / 2009	130		35
TOTAL PAJILLAS CONGELADAS	3.722		

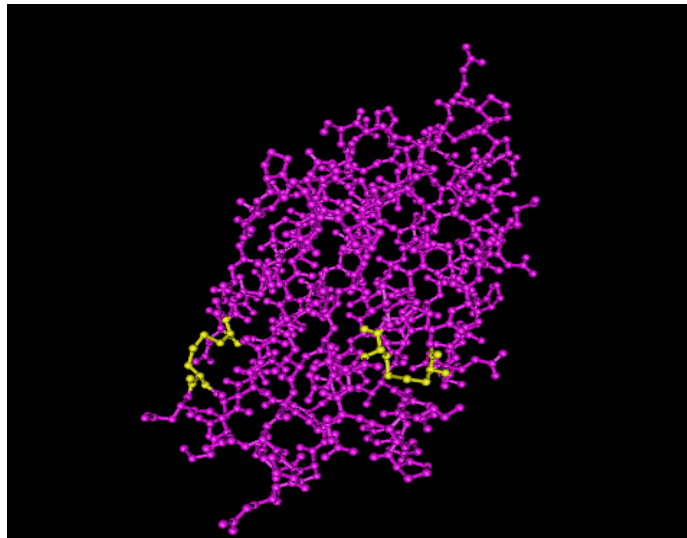
SANMARTINERO 04 – 119

El toro hacía parte del Banco de Germoplasma Animal In Situ, y fue vendido a Corpoica, donde se realizaron los trámites para obtener el Certificado de Inscripción de Animales Donantes de Material Seminal. En la actualidad el toro se encuentra en descanso sexual, anexo se relacionan las congelaciones realizadas hasta el momento.

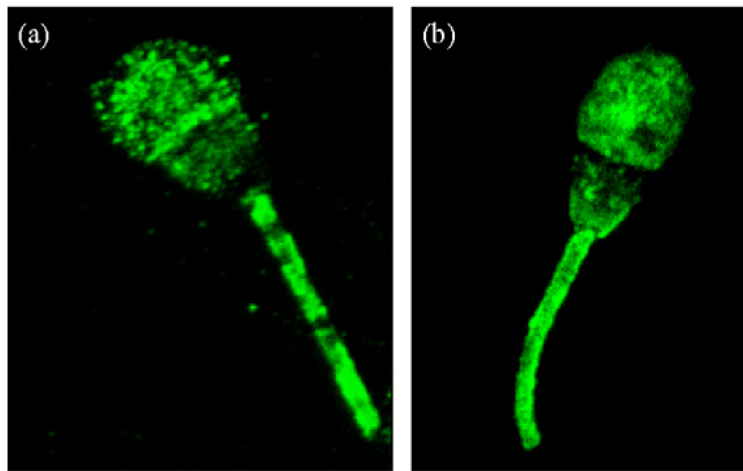
Pajillas Congeladas

Fecha Congelación	Numero Pajillas Congeladas	Uso Pajillas	Motilidad Pos descongelación %
6 Mayo / 2009	122	BGAIV	40
24 Agosto / 2009	276	Fomento FEDEGAN	40
1 Septiembre / 2009	278	Fomento FEDEGAN	40
21 Octubre / 2010	49	Proyecto PROTEOMICA	40
1 Diciembre / 2010	49	Proyecto PROTEOMICA	30

F. Anexo: Estructura tridimensional de la proteína α SFP elaborada a través del programa Cn3D 4.1, a partir de la secuencia de aminoácidos reportada por la NCBI proteins. En amarillo la posición de las cisteínas que forman puentes bisulfuro con potencial de oxido-reducción.



G. Anexo: Espermatozoides sometidos a inmunofluorescencia para determinar los patrones de unión de proteínas BSP A1 y A2. (a) Espermatozoide con acrosoma intacto incubado con fluido itsmico no luteal y (b) Espermatozoide con acrosoma intacto incubado con fluido ampular. Se aprecia alta fluorescencia en la parte media del espermatozoide lo que indica altos patrones de adhesión de proteínas BSP. Tomado de: Souza., 2008



H. Anexo 1. Estructura primaria de las proteínas BSP. Los puntos de unión a los carbohidratos se representan con puntos Tomado de: Manjunath y Therien., 2002

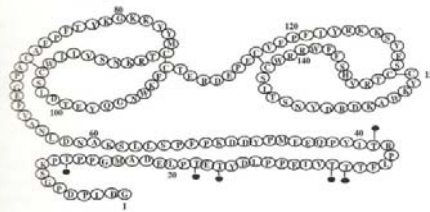
BSP-A1/-A2 proteins



BSP-A3 protein



BSP-30-kDa protein



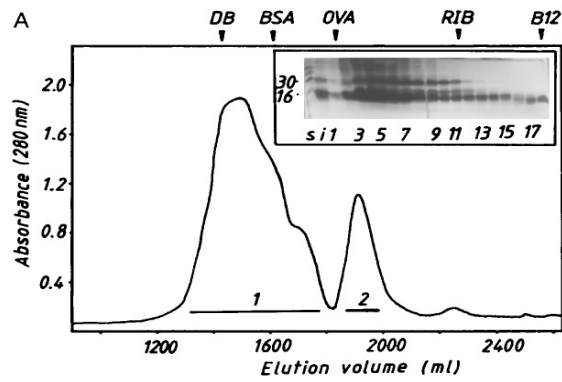
I. Anexo: Cromatógrafo de baja presión Bio Logic de BioRad con colector de fracciones automático y columna con matriz de sefacril S-100



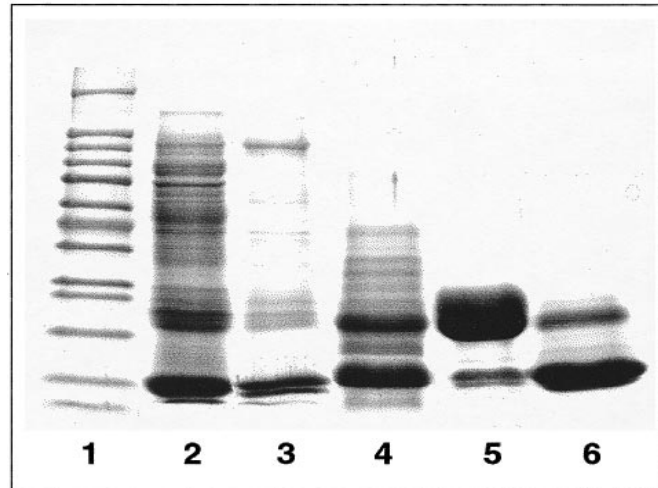
J. Anexo : Celda de Ultrafiltración con corriente de nitrógeno Amicon de Millipore®



K. Anexo: Cromatograma y Electroforesis en 1 dimensión de las proteínas obtenidas en las fracciones colectadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de Sefacril S-50. Tomado de: Calvete., 1996



L. Anexo: Electroforesis SDS de 1) Marcador de peso, 2) plasma seminal ovino completo y 3 a 6) fracciones eluidas por cromatografía mediante el uso de columnas de Sephacril S-100. Tomado de Barrios, 2000



M. Anexo: Proteínas de plasma seminal bovino relacionadas con la congelabilidad del semen. Las flechas arriba indican la dirección del gradiente de pH de básico (-) a ácido(+) y viceversa. En la mitad se muestra el marcador de peso molecular. Las flechas dentro de la imagen señalan los puntos que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los toros de A) alta congelabilidad y B) baja congelabilidad. Tomado de: Jobim, 2004

