

UN PRODUCTO



www.corpoica.org.co



LA FERTILIDAD DEL REPRODUCTOR VISTA DESDE LA PROTEÓMICA





Comité de
Ganaderos
del Meta



LA FERTILIDAD DEL REPRODUCTOR VISTA DESDE LA PROTEÓMICA

**Jaime Antonio Cardozo¹, Fabián Leonardo Rueda²,
Rocío Fenney Herrera³, José Henry Velásquez⁴, Miguel Ángel Peña⁵,
Eliana Neira⁶, José Guillermo Velásquez⁷**

-
1. MVZ. Ms.C. Ph.D. Investigador Ph.D. Laboratorio Microbiología Molecular, CBB-CORPOICA. C.I. Tibaitatá
 2. Lic. en Química. Ms.C. Investigador P. Laboratorio Microbiología Molecular, CBB-CORPOICA. C.I. Tibaitatá
 3. Zootecnista. Investigador P. Laboratorio Microbiología Molecular, CBB-CORPOICA. C.I. Tibaitatá
 4. MVZ. Ms.C. Investigador Ms.C. Centro de Reproducción Integral Animal, CORPOICA. C.I. La Libertad
 5. MVZ. Ms.C. Investigador P. Centro de Reproducción Integral Animal, CORPOICA. C.I. La Libertad
 6. MVZ. Investigador P. Centro de Reproducción Integral Animal, CORPOICA. C.I. La Libertad
 7. MV. Ms.C. Ph.D. Investigador Ph.D. Centro de Reproducción Integral Animal, CORPOICA. C.I. La Libertad

Jaime Antonio Cardozo, Fabián Leonardo Rueda, Rocío Feney Herrera, José Henry Velásquez, Miguel Ángel Peña, Eliana Neira, José Guillermo Velásquez / La fertilidad del reproductor vista desde la proteómica. Bogotá: Corpoica, 2011. 48p.

Palabras clave: Proteómica, Toro Sanmartinero, Toro Cebú Brahman. reproducción bovina, fisiología reproductiva, semen bovino, plasma seminal, proteínas de membrana.



Comité de Ganaderos del Meta



©Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA

Línea de atención al cliente: 018000121515
atenciónalcliente@corpoica.org.co
www.corpoica.org.co

ISBN: 978 958 740 080 9
CA: C0141
CUI: 1312
Primera edición: Enero de 2012
Tiraje: 500 ejemplares

Edición: Jaime Cardozo C., Elizabeth Martín M.

Producción editorial:



www.simbiosis.co

Impreso en Colombia
Printed in Colombia

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 1.	
LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE UNA MUESTRA SEMINAL COMO INDICADORA DEL POTENCIAL FERTIL DE UN TORO	7
• Evaluación inicial del semen	9
• Motilidad Espermática	10
• Evaluación de la Motilidad Espermática	11
• Viabilidad Espermática	11
• Morfología Espermática	12
CAPÍTULO 2.	
PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DE TOROS SANMARTINERO Y CEBÚ	14
• La electroforesis en geles de poliacrilamida para separar proteínas del plasma seminal bovino	15
• Proteínas del plasma seminal	17
• Perfiles electroforéticos de las proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú	18
• Relación entre las proteínas del plasma seminal y la calidad seminal	22
CAPÍTULO 3.	
LA ADICIÓN DE PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL, UNA ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA VIABILIDAD POST- DESCONGELACIÓN	25
• Metodología	25
• Separación de las proteínas del plasma seminal por cromatografía de exclusión por tamaño	25
• Adición de las proteínas separadas a semen criopreservado	26
• Resultados	27
• Cromatografía de exclusión y separación de fracciones	27
• Adición de las fracciones cromatográficas	28
• Conclusiones	31

CAPÍTULO 4.

PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL

- | | |
|---|----|
| | 32 |
| • Obtención de las proteínas de membrana. | 35 |
| • Separación electroforética de las proteínas de membrana | 36 |
| • Electroforesis unidimensional | 36 |
| • Electroforesis bidimensional | 39 |
| • Conclusiones | 40 |

BIBLIOGRAFÍA

41

INTRODUCCIÓN

Comprender el proceso fisiológico reproductivo, ha sido uno de los grandes retos de la investigación, y el motivo de interminables horas de estudio de los grupos de científicos en todo el mundo. Unido a este emprendimiento se suma, la necesidad de mejorar los índices reproductivos de los sistemas de producción animal, con miras a suplir las necesidades alimenticias de la población humana, que cada día se multiplica incontrolablemente.

La participación del macho bovino en los índices reproductivos se puede modificar por factores medioambientales, que inciden en el adecuado funcionamiento del espermatozoide, y por tanto en el complejo proceso de la fertilización.

El objetivo de esta publicación, es el de presentar adelantos de nuestra más reciente investigación, en el área de la reproducción bovina, a través del empleo de herramientas biotecnológicas y moleculares, que permiten abordar y comprender de forma más exacta, el desempeño fisiológico del espermatozoide, su organización estructural, y el efecto que sobre la misma, ejercen factores estresantes como el choque térmico por frío.

Los avances aquí presentados son los primeros reportes que se tienen acerca de elementos fundamentales para el normal funcionamiento del gameto masculino, de una raza criolla colombiana, como lo son las proteínas tanto del plasma seminal como de la membrana plasmática. Las técnicas utilizadas, comprendieron todo un conjunto de procedimientos de la biología molecular (proteómica) y la química elemental, donde los procedimientos de separación molecular como la electroforesis bidimensional y la cromatografía, se convirtieron en herramientas del quehacer diario en nuestro laboratorio.

Los trabajos iniciales permitieron la estandarización de los diferentes protocolos para obtener una muestra adecuada de proteínas tanto de plasma seminal, como de espermatozoides, establecer la cantidad óptima de proteína, tanto de plasma seminal como de membrana plasmática, que junto al empleo de tampones de solubilización específicos para las distintas muestras estudiadas, permitieran la obtención de geles con alta resolución de los puntos de proteína.

El plasma seminal de los mamíferos es un fluido complejo que sirve como medio de transporte al espermatozoide desde el testículo hasta su encuentro con el ovocito (Thomas 2003), y contiene una variedad de componentes bioquímicos, algunos de ellos relativamente específicos en la regulación del funcionamiento del espermatozoide. Se han descrito importantes acciones de las proteínas del plasma seminal en aspectos tales como la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides del eyaculado, e igualmente en aspectos claves como la capacitación y la interacción entre los gametos.

En este trabajo, se estableció el mapa referencial en dos dimensiones de las proteínas del plasma seminal y de la membrana plasmática del espermatozoide bovino de las razas Cebú Brahman y Sanmartinero, así como también las posibles relaciones con los porcentajes de espermatozoides viables y mótils, y con la concentración espermática del eyaculado.

Las correlaciones positivas y/o negativas que se establecieron entre algunos puntos de proteína y las variables de calidad seminal mencionadas, sugieren que podrían interaccionar conjuntamente para asegurar un adecuado funcionamiento del espermatozoide.

Se comprobó así mismo, que la adición de proteínas del plasma seminal a espermatozoides congelados-descongelados y sometidos a incubación, provoca un incremento en el porcentaje de espermias viables, en relación con aquellos a los que no se agregó proteína alguna.

Estos estudios, permitieron generar conocimiento básico acerca de la expresión de las principales proteínas presentes en el plasma seminal y la membrana plasmática del espermatozoide bovino de una de las razas criollas colombianas y el Cebú Brahman, en condiciones de nuestro trópico. Así mismo, se aportaron datos del efecto de la incubación de espermatozoides congelados-descongelados, con proteínas del plasma seminal, en el porcentaje de viabilidad espermática.

Los resultados de esta investigación son los primeros, que se reportan a este nivel en Colombia y motivan la realización de investigaciones futuras con otras razas criollas colombianas, con el objetivo de poder establecer estrategias de manejo del espermatozoide, que permitan incrementar la eficiencia reproductiva del sistema de producción bovino.

Jaime Antonio Cardozo Cerquera.
MVZ, Ms.C., Ph.D.

CAPÍTULO 1. LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE UNA MUESTRA SEMINAL COMO INDICADORA DEL POTENCIAL FÉRTIL DE UN TORO

El desarrollo de pruebas de laboratorio, para predecir la capacidad fecundante del semen de un reproductor, ha sido motivo de gran preocupación por parte de los investigadores. El método más fiable para determinar la capacidad fecundante de un eyaculado, es la inseminación de un gran número de vacas (Amann, 1989), no obstante, el método es muy costoso, la información sobre los resultados es muy tardía, y puede ser afectada por multitud de factores dependientes tanto de la hembra como del inseminador, y por tanto, modificar los resultados obtenidos.

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente dependa, de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario (Muiño R., 2008).

Uno de los problemas de usar toros jóvenes en los programas reproductivos, es que su fertilidad en campo no ha sido probada. En este sentido, el tener un método eficiente, simple y preciso para predecir el potencial fértil de una muestra de semen, se convierte en una necesidad para la industria ganadera (Al Naib y col., 2011).

La evaluación de la calidad (*in vitro*) convencional del semen, se basa en la determinación de los valores de concentración, motilidad, morfología y viabilidad espermáticas. Varias técnicas de tinción se han usado para evaluar la viabilidad del espermatozoide, el estado de capacitación, la integridad de la membrana, la integridad de la cromatina, el estado del acrosoma y la actividad mitocondrial. Aunque estas medidas son útiles para la evaluación del espermatozoide *in vitro*, tienen limitada habilidad para predecir la fertilidad en campo (Rodríguez H., 2006).

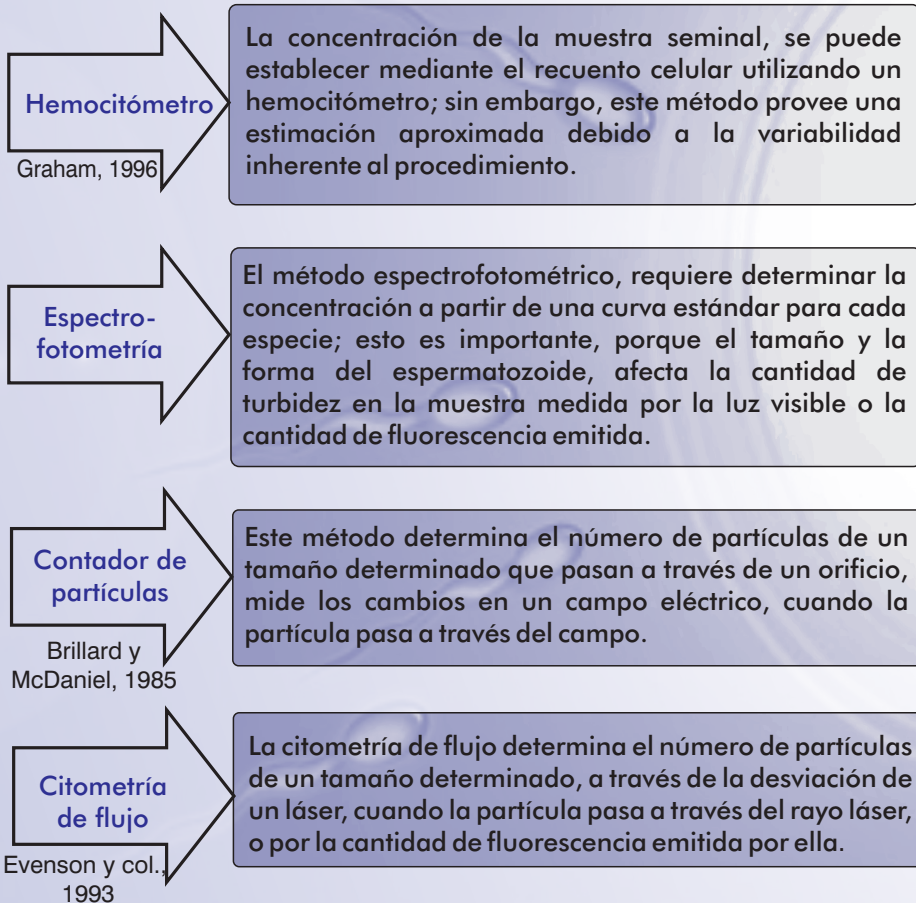
• Evaluación inicial del semen

La evaluación inicial de una muestra seminal se realiza inmediatamente después de la colección del eyaculado, e incluye la apariencia, la cual debe ser uniforme, y en muchas especies tienen un color cercano al blanco (Mocé y Graham, 2008).

El semen de algunos toros contiene grandes cantidades de riboflavina, que le proporciona un color amarillo, estos eyaculados no tienen olor a orina. Los eyaculados deben estar libres de sangre o de material purulento, el cual es indicativo de una infección del tracto reproductivo. Además de la apariencia, se debe determinar el volumen del eyaculado, el cual se puede determinar usando tubos colectores graduados.

La concentración espermática del eyaculado, es otro de los parámetros a determinar, y debe realizarse para establecer la dilución necesaria antes de su uso, o para la congelación, de tal forma que se obtenga un número conocido de espermatozoides por dosis seminal.

La concentración espermática de la muestra seminal, se puede establecer con los siguientes métodos:



• Motilidad Espermática

La capacidad de movimiento del espermatozoide se considera el primer criterio de calidad, ya que el transporte espermático en el tracto femenino y la capacidad de penetración del ovocito dependen, en gran medida, de este parámetro (Salamon, 1987; Guérin, 1990). En este sentido, estudios detallados del transporte y la fertilización, han revelado que la calidad y tipo de movimiento flagelar, son críticos para fases específicas de la función espermática de los mamíferos en el tracto femenino (Yeung y Ng, 2000).

El movimiento activo de los espermatozoides es fundamental durante el tránsito por el tracto genital de la hembra, para la colonización del oviducto, y para alcanzar el sitio donde tiene lugar la fecundación; así mismo, la motilidad es una manifestación de vitalidad espermática. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente se debe descartar y no conservarse (Holt y Van Look, 2004).

Las mitocondrias representan la central energética del espermatozoide (Figura 1), y suministran energía, en forma de ATP, que permite el movimiento del flagelo (Muiño R., 2008). El movimiento rotacional que experimenta el flagelo se transmite a la cabeza del espermatozoide a través del cuello, que en última instancia, otorga progresividad al movimiento espermático (Mortimer, 2000). Igualmente, la motilidad espermática está condicionada por la gestión del metabolismo energético de la célula (Rigau y col., 2001).

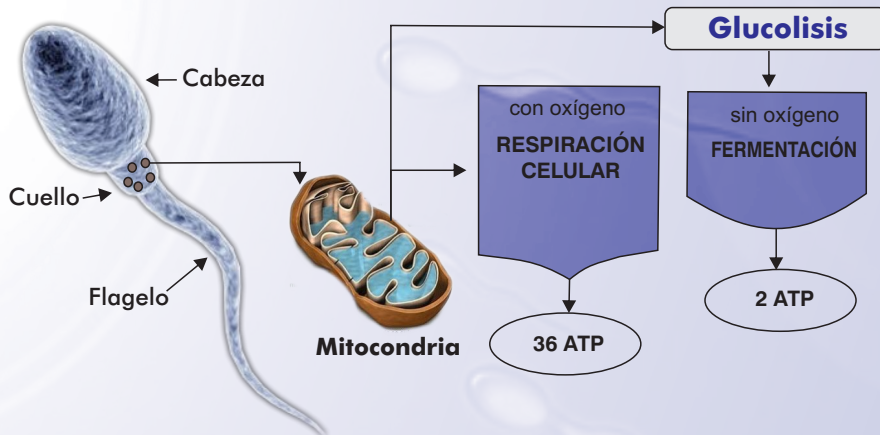


Figura 1. Producción de energía en la mitocondria del espermatozoide

La utilización de cualquiera de las dos vías para la obtención de energía por parte del espermatozoide, va a depender de las condiciones del medio en que se encuentra (pH extracelular, presión de O₂, composición del medio), así como de la actividad que está desarrollando la célula espermática en el

momento que se analiza su estatus metabólico (Muiño, R. 2008). Cabría pensar que en condiciones de elevado consumo energético, la célula tiende a utilizar la ruta oxidativa (ciclo de Krebs), que es más eficiente en términos de producción de ATP que la vía glucolítica (Rodríguez-Gil, 2006).

• Evaluación de la Motilidad Espermática

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato, pero es altamente subjetivo, y los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000; Phillips y col., 2004). De otra parte, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles, por lo que no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford y col., 1976).

Con el ánimo de eliminar la subjetividad de la valoración de la motilidad espermática, el avance tecnológico dió paso al desarrollo de los sistemas computarizados (CASA), para el análisis de la motilidad espermática. Los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se ha vuelto más asequible. Los programas diseñados para los sistemas CASA, incluyen una serie de descriptores del movimiento espermático que escapan al ojo humano, tales como:

- Porcentajes de motilidad total o de motilidad progresiva: en función de su velocidad curvilínea (VCL) o de su velocidad media (VAP), los espermatozoides son clasificados en estáticos, móviles progresivos o móviles no progresivos; y dentro de los móviles, en rápidos, medios y lentos.
- Parámetros que definen la velocidad de los espermatozoides (Mortimer, 2000): VCL (Velocidad Curvilínea), VSL (Velocidad rectilínea); VAP (Velocidad Media), LIN (Índice de Linealidad), STR (Índice de Rectitud), WOB (Índice de Oscilación).
- Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza: ALH (Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza), BCF (Frecuencia de batido).

Al final del proceso, el CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar y col., 1991).

Además de un estudio minucioso de la motilidad, los sistemas computarizados, también permiten realizar medidas de las dimensiones de la cabeza espermática (Figura 2). Se conocen como sistemas ASMA (Assisted Sperm Morphology Analysis), y están diseñados para realizar medidas del área, perímetro, longitud y anchura de las cabezas espermáticas presentes en una extensión de semen fijada y teñida. Es interesante disponer de los datos morfométricos de las dosis seminales, puesto que se ha comprobado que la morfometría anormal de las cabezas espermáticas influye negativamente en la fertilidad de los sementales bovinos (Gravance y col., 1996).

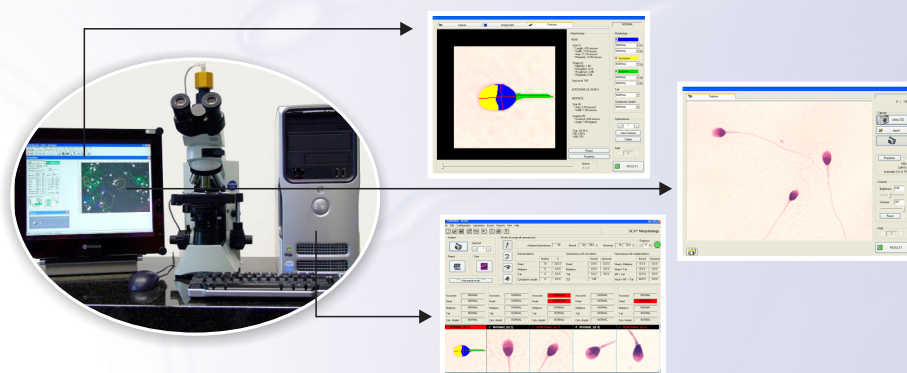


Figura 2. Análisis morfológico con el sistema CASA

- **Viabilidad Espermática** (Integridad de la membrana plasmática)

La viabilidad es un parámetro para evaluar la integridad de la membrana teniendo en cuenta que una membrana íntegra es esencial para el correcto funcionamiento de la célula, y que el éxito de la fertilización requiere de una membrana plasmática íntegra y funcional (Flesch y Gadella, 2000).

Para valorar la integridad de la membrana espermática, se emplean pruebas de microscopía utilizando distintos fluorocromos: diacetato de carboxifluoresceína, CFDA (Harrison y Vickers 1990) y SYBR (Garner y Johnson, 1995; Nagy y col., 2003), que son los más utilizados en combinación con yoduro de propidio (IP). También se han descrito otras pruebas de fluorescencia que utilizan Bromuro de etidio, Hoechst 33258 o diacetato de carboxidimetil-fluoresceína (CDMFDA).

Garner y col., (1986) y Harrison y Vickers (1990), desarrollaron un método para evaluar la integridad de la membrana en espermatozoides de distintas especies, basado en una tinción que utiliza dos fluorocromos que se comportan de diferente manera frente a los espermatozoides. El diacetato de carboxifluoresceína es capaz de penetrar en el espermatozoide intacto,

debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a este compuesto; en el interior, es hidrolizado por esterasas inespecíficas. La carboxifluoresceína libre resultante es fluorescente, y si la membrana plasmática está intacta queda retenida en el interior de la célula dando fluorescencia verde por toda ella. El yoduro de propidio por el contrario, penetra únicamente en los espermatozoides con la membrana dañada, uniéndose al DNA y dándoles una intensa fluorescencia roja (Foto 1).

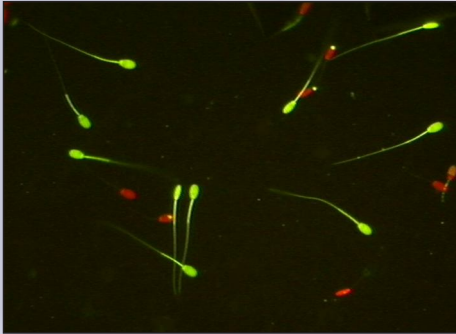


Foto 1. Espermatozoides viables (color verde), espermatozoides no viables (color rojo). Tinción Diacetato de Carboxifluoresceína y Ioduro de propidio

Finalmente, se ha incorporado para el análisis de la integridad de membrana, la citometría de flujo, obteniéndose correlaciones entre esta técnica y las pruebas microscópicas, que validan su uso como un método preciso y objetivo (Garner y col., 1986; Peña y col., 1998). De tal forma, que el estudio de la integridad de membrana por métodos de fluorescencia, es de gran utilidad como parámetro de calidad, y para la estimación del daño producido en el espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación y por tanto para la evaluación de la eficiencia de estos procesos (Valcarcel y col., 1994).

• Morfología Espermática

La morfología espermática es el principal reflejo del estado fisiológico o patológico del macho, para la producción y almacenamiento del semen en los conductos extragonadales (Saacke, 1983). Se asume que la variación en la morfología espermática se origina durante la espermatogénesis, cuando el efecto del genotipo influencia la estructura espermática. Esta asociación genética con la morfología, se ha demostrado por el relativo incremento en la proporción de espermatozoides morfológicamente anormales, en animales con elevados coeficientes de fallos en la reproducción (Roldan y col., 1998).

Diversos estudios han puesto de manifiesto la correlación entre las morfoanomalías espermáticas y la fertilidad (Colas, 1981). Parece ser que se produce un impedimento selectivo en el transporte de espermatozoides morfológicamente anormales en el tracto femenino, especialmente en el caso de espermatozoides con cabezas anormales (Saacke y col., 1998).

La evaluación de la morfología espermática, se ha realizado tradicionalmente mediante observaciones microscópicas, aunque se han ido desarrollando tecnologías más sofisticadas asistidas por ordenador para las evaluaciones morfométricas. Estas evaluaciones permiten obtener valores más reproducibles y con mayor valor predictivo de la fertilidad. Además, permiten discriminar distintas subpoblaciones presentes en un eyaculado, con una significación adaptativa y fisiológica, así como variaciones interindividuales respecto a la susceptibilidad a la congelación, que permitirían diferenciar entre buenos y malos “congeladores” (Thurston y col., 2001).

Por otro lado, se ha descrito que el análisis multiparamétrico de la cabeza (forma de la cabeza; tamaño del acrosoma; presencia de vacuolas acrosomales, etc), permite obtener un mejor valor predictivo sobre la fertilidad obtenida por fertilización *in vitro* (El-Ghobashy y West 2003).

La clusterina (proteína de origen testicular y epididimal), se ha detectado en espermatozoides de diversas especies con anomalías morfológicas, y se ha descrito que una espermatogénesis anormal es la causa de un aumento del número de células que contienen esta proteína (Ibrahim y col., 2001).

Las investigaciones de nuestro grupo, han evidenciado diferencias estadísticas entre las muestras de semen de toros Sanmartinero y Cebú Brahman, para las variables de viabilidad espermática y concentración espermática. En la tabla 1, se puede apreciar un mayor porcentaje de espermatozoides viables ($p < 0.05$), y una mayor concentración de espermatozoides ($p < 0.001$) en el semen eyaculado de toros Sanmartinero, con respecto a los encontrados en los toros Cebú Brahman. Estos resultados se asemejan a los reportados en trabajos anteriores de nuestro grupo.

Tabla1. Valores de viabilidad, motilidad y concentración espermática en semen de toros de las razas Sanmartinero y Cebú Brahman

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

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

Igualmente, aunque no se encontraron diferencias estadísticas en los porcentajes de espermatozoides móviles, sí se evidenciaron diferencias numéricas a favor de los toros Sanmartinero. Estos resultados sugieren de alguna manera, una mayor fertilidad en los toros Sanmartinero.

CAPÍTULO 2. PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DE TOROS SANMARTINERO Y CEBÚ

Uno de los problemas que afecta la eficiencia de los sistemas de producción ganadera, es la baja fertilidad del macho bovino. En este sentido, gran número de investigaciones se han encaminado al desarrollo de metodologías que permitan predecir con mayor seguridad y precisión la fertilidad del reproductor. Entre estas metodologías se encuentran la determinación de la calidad seminal, la determinación *in vitro* de los porcentajes de fertilidad, la prueba de inducción *in vitro* de la reacción acrosómica, el test hiposmótico, la evaluación de la integridad de la cromatina, evaluación del estado acrosomal y la actividad mitocondrial entre otras. Sin embargo, los resultados al aplicar estas metodologías no son consistentes, pues no tienen en cuenta aspectos relacionados con el proceso mismo de la fecundación, tales como la capacitación espermática, la habilidad del espermatozoide para alcanzar el sitio de fertilización y fecundar el óvulo, y la habilidad para activar el desarrollo exitoso del embrión.

El avance en los procedimientos moleculares, han encaminado la investigación hacia la identificación de componentes seminales, directamente relacionados con la fertilidad del espermatozoide. Tal es el caso del estudio de la estructura y funcionamiento de las proteínas del plasma seminal, que han mostrado ser candidatas a convertirse en marcadores de la fertilidad bovina.

Se sabe que el plasma seminal está compuesto por un conjunto de secreciones, de las cuales el espermatozoide incorpora los componentes necesarios para su supervivencia y capacidad fecundante. Entre los componentes del plasma seminal, algunas proteínas juegan un papel importante; estas se adsorben a la célula espermática, gracias a su afinidad por los lípidos presentes en la membrana plasmática, e inducen procesos como la capacitación espermática y la reacción acrosómica, y estimulan la afinidad por la zona pelúcida del oocito, e incluso participan en la fusión de los gametos.

La separación por medio de técnicas electroforéticas de las proteínas del plasma seminal, y su posterior identificación, así como el establecimiento del papel que juegan en el funcionamiento del espermatozoide, pueden llevar a encontrar la explicación sobre la fertilidad de un reproductor. La presencia o ausencia de proteínas específicas, así como la diferencia en su cantidad

relativa, podrían explicar las diferencias en fertilidad de los reproductores. Este escrito evidencia las diferencias en los perfiles electroforéticos bidimensionales de las proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú Brahman, y la relación existente entre las proteínas del plasma seminal y la calidad espermática.

- **La electroforesis en geles de poliacrilamida para separar proteínas del plasma seminal bovino**

La proteómica, es aceptada como el método más eficaz para el análisis de proteínas, producto de la expresión de los genes. El análisis proteómico a diferencia del genómico, permite establecer la expresión dinámica de las proteínas de un organismo, célula o tejido, en respuesta a estímulos internos y externos, permitiendo un mayor entendimiento de los procesos celulares.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se considera la base de las herramientas proteómicas, dado que es capaz de separar simultáneamente gran cantidad de proteínas (Figura 3). La SDS-PAGE comprende la separación de las proteínas por peso molecular (una dimensión o 1D), y la separación por punto isoeléctrico y peso molecular (2D-PAGE o en dos dimensiones). En la SDS-PAGE, las proteínas se separan de acuerdo con su peso molecular (tamaño), 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 (Figura 4A).

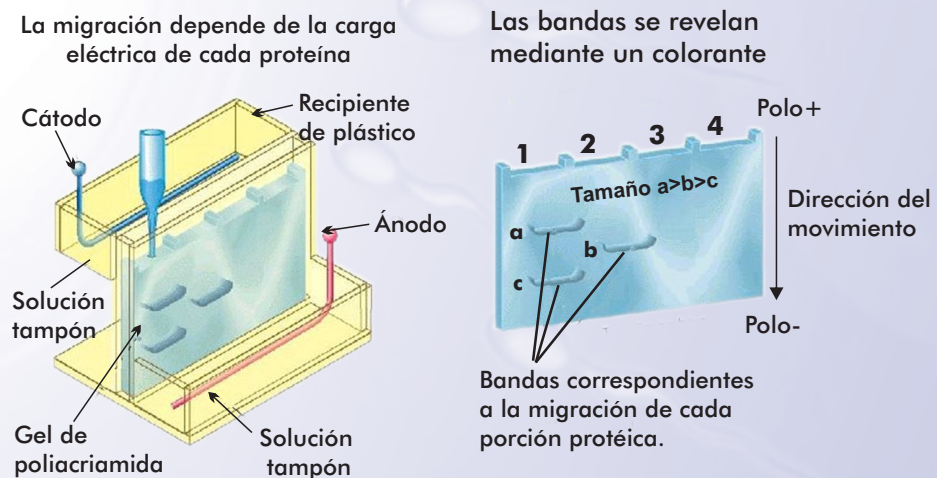


Figura 3. Electroforesis en geles de poliacrilamida
(Adaptado de www.matragut.wordpress.com/la-revolucion-genetica)

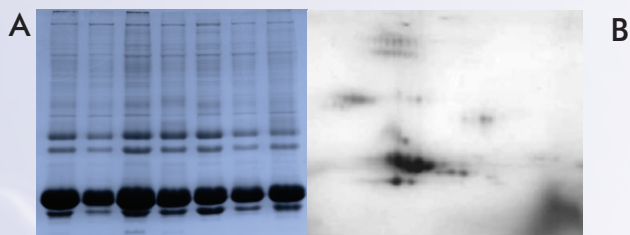


Figura 4. A) electroforesis unidimensional de proteínas de plasma seminal bovino y B) electroforesis bidimensional de proteínas de plasma seminal bovino

En la 2D-PAGE (Figura 4B), previa a la separación por peso molecular, se realiza una separación por punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque (IEF). Esta separación, se realiza mediante el uso de un gradiente de pH en el que 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 (pI). La 2D-PAGE, se considera más específica y valiosa por la información que arroja acerca de las características del proteoma de una muestra.

Esta se desarrolló por primera vez por O'Farrell en 1975 y 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 (Figura 5).

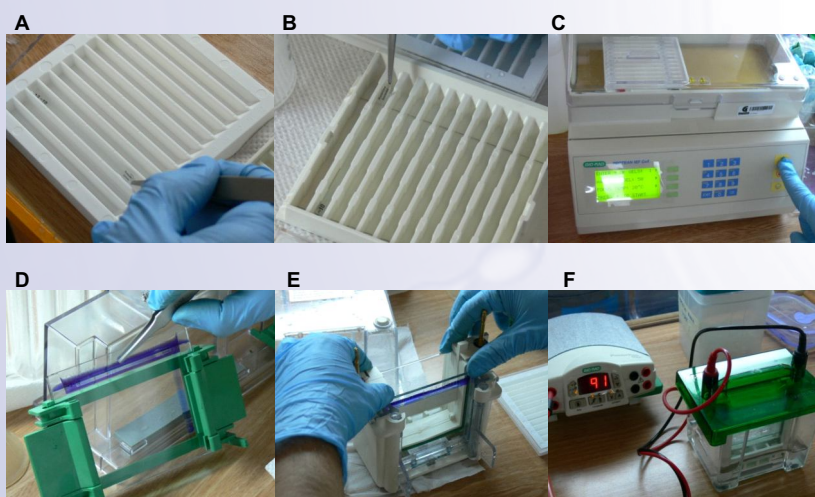


Figura 5. Electroforesis bidimensional. A) hidratación de tiras de isoelectroenfoque, B) bandeja de isoelectroenfoque, C) cámara de isoelectroenfoque, D) tira de isoelectroenfoque añadida al gel de poliacrilamida por medio de agarosa, E) ensamble de la cámara vertical para la segunda dimensión y F) segunda dimensión de la electroforesis

- **Proteínas del plasma seminal**

El plasma seminal es una 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 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, 1993) y están involucradas en cambios que sufre el espermatozoide, previos a la fecundación.

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 y col., 1994); posteriormente y tras determinar su estructura, se designaron como proteínas PDC 109. Estas últimas son las más abundantes en el plasma seminal, con concentraciones de 15 a 25 mg/mL de plasma seminal. Los análisis revelan 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. Los dominios de fibronectina demuestran una habilidad especial para unirse a los lípidos.

El papel de las proteínas BSP está relacionado con la variación lipídica que ocurre en la membrana espermática, durante la capacitación y la reacción acrosómica. Las BSP se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide, por interacción con fosfolípidos que contienen fosforilcolina, provocando la decapitación del espermatozoide y previniendo la capacitación prematura del mismo (Souza, 2008). En su conjunto, las BSP representan del 40 al 57 % (Manjunath, 1987) del total de las proteínas 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%).

En el ovino, se ha reportado además, la presencia de otro tipo de proteínas en el plasma seminal, que aunque 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 sufridos por el esperma 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 (Cardozo, 2006), son las responsables de este efecto protector (Fernández y Col., 2006). Estos últimos hallazgos abren la puerta al desarrollo de alternativas moleculares para el mejoramiento de la habilidad fecundante del espermatozoide.

- **Perfiles electroforéticos de las proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú**

Los mapas electroforéticos de las proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú, presentan ciertas semejanzas en cuanto a la ubicación de muchos de los puntos (Figura 6).

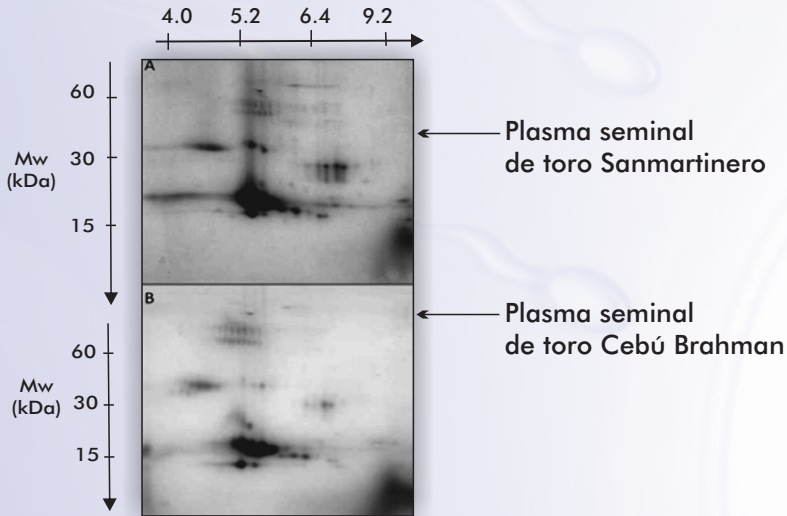


Figura 6. Geles bidimensionales de proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú Brahman. Se señala en la parte izquierda la escala de pesos moleculares y en la parte superior la de puntos isoeléctricos.

El análisis de los mapas proteómicos de los toros Sanmartinero, evidenciaron la presencia de 75 puntos con pls entre 3.6 y 9.8 y pesos moleculares (M_w) entre 9.2 y 78.5 Kilodalton (kDa). Así mismo, se encontró que el 85.3 % de los puntos detectados, tienen pH ácido. Por su parte, en el mapa proteómico del plasma seminal de los toros Cebú Brahman, se detectó un total de 67 puntos de proteína, con pls entre 3.9 y 9.8; y pesos moleculares entre 12.3 y 76.0 kDa. El 76 % de estos puntos presentan pH ácido (Figura 6).

Así mismo, al comparar el proteóma del plasma seminal de las dos razas, se evidenció la presencia de 11 puntos de proteína exclusivos de los toros Sanmartinero (Figura 7). Estos puntos presentan pesos moleculares entre 9.2 y 71.2 kDa, 3 de los cuales presentan pl mayor a 7. El punto "1001" (M_w de 12 kDa y pl de 4.3), es el punto exclusivo de plasma de Sanmartinero, que se presenta con mayor frecuencia en las muestras analizadas (Tabla 2).

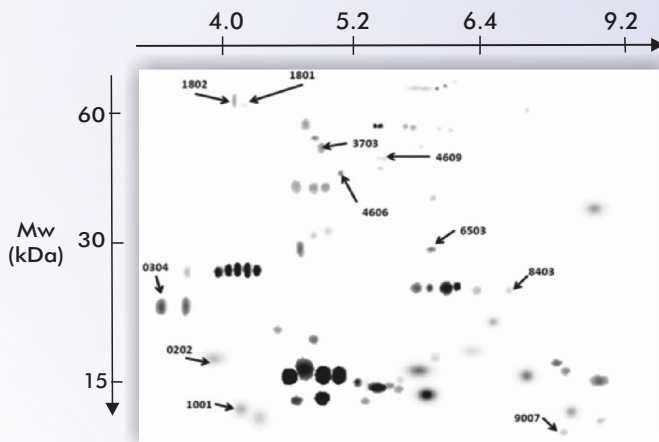


Figura 7. Gel virtual obtenido a partir de geles de proteínas de plasma seminal de toros Sanmartinero. Las flechas señalan los puntos exclusivos detectados en plasma seminal de esta raza

Tabla 2. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos 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 isoeléctrico (pH)	n
1801	69.4	4.2	7
1802	71.2	4.0	7
0304	23.2	3.6	5
0202	18.2	3.8	6
1001	12,0	4,3	11
3703	55.3	5.2	9
4606	48.2	5.3	7
4609	52.2	5.7	5
6503	32.1	6.1	5
8403	25.1	7.7	7
9007	9,2	8,99	10

En lo que respecta al mapa electroforético del plasma seminal de los toros Cebú Brahman, existen 15 puntos que solo aparecen en muestras de ésta raza (Figura 8). Estos puntos tienen un rango de pI entre 4.8 y 9.8, y pesos moleculares entre 12.5 y 73.5 kDa

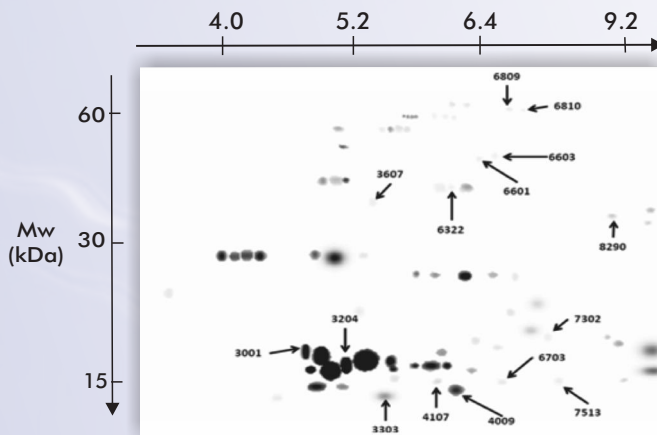


Figura 8. Gel virtual obtenido a partir de geles de proteínas de plasma seminal de toros Cebú Brahman. Las flechas señalan los puntos exclusivos detectados en plasma seminal de esta raza

Los puntos "3001" y "3204" aparecen en todos los mapas de los toros Cebú Brahman 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 pl superior a 7 (Tabla 3). Los puntos 3001 y 3204, presentaron pl y Mw cercanos y similares a los reportados para las proteínas BSP, lo que podría sugerir que se trata de alguna isoforma de estas proteínas que se expresa en toros de esta raza.

Tabla 3. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los puntos de proteína exclusivos de la raza Cebú Brahman. Se señalan los puntos que se presentaron con mayor frecuencia

Punto de proteína	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pH)	n
3001	16,4	4,8	26
3204	15,5	5,4	26
3607	46,8	5,2	8
3303	12,5	5,6	22
4107	13,6	6,1	12
4009	12,9	6,4	6
6322	44,7	6,6	8
6601	53,6	6,8	12
6603	54,6	7,0	10
6703	13,6	7,2	14
7302	18,5	7,7	8
7513	15,7	8,2	6
6809	73,5	7,3	8
6810	73,5	7,5	8
8290	37,2	9,1	7

De otro lado, al comparar las cantidades relativas (determinadas a partir de la densidad óptica de cada punto) de los puntos de proteína presentes en ambas razas, y obtenidas mediante el programa de análisis de imágenes (PD Quest), se encontró que diez de estos puntos presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 9), cinco (puntos 3203, 3606, 3503, 4102 y 8301) con mayor cantidad en toros Sanmartinero y los puntos 1402, 2202, 4002, 6806 y 9002, con mayor cantidad en toros Cebú (Tabla 4).

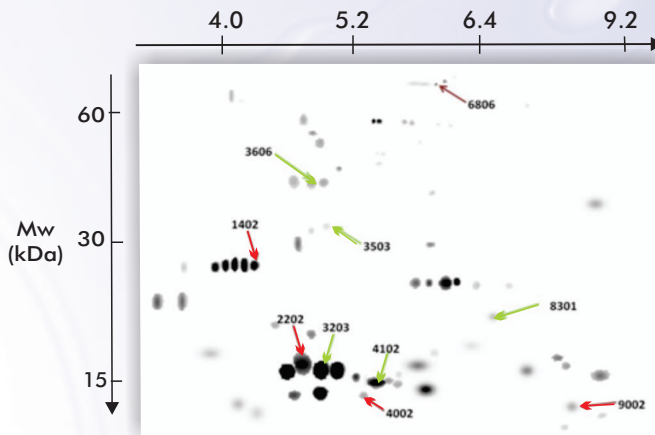


Figura 9. Puntos que coinciden en los mapas electroforéticos de plasma seminal de las razas Sanmartinero y Cebú Brahman. Se señalan con flechas verdes los que presentan mayor cantidad relativa en plasma de toros Sanmartinero y con flechas rojas los que presentan mayor cantidad relativa en plasma de toros Cebú

Tabla 4. Puntos de proteína que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se compararon las cantidades relativas de cada punto en las razas Sanmartinero y Cebú Brahman

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)
Sanmartinero	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	2.92 ± 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)
Sanmartinero	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	2.05 ± 0.64	4.99 ± 1.83	2.61 ± 0.66	5.36 ± 1.39

- **Relación entre las proteínas del plasma seminal y la calidad seminal**

La relación entre la concentración de cada punto de proteína y las variables de calidad seminal (viabilidad, motilidad, concentración), se estableció mediante la prueba de correlación de Pearson en cada una de las razas.

Los resultados muestran que, un punto de proteína de 16.2 kDa y pl 5.5, correlacionó positivamente con la viabilidad espermática ($r=0.64$ $p<0.001$) en la raza Sanmartinero; mientras que en la raza Cebú Brahman, la correlación con viabilidad ($r =0.56$ $p<0.05$) se estableció con un punto de 69.9 kDa y pl 6.3. Se presentaron también, otras correlaciones con viabilidad, aunque con un coeficiente menor (Tablas 5 y 6).

En las tablas 5 y 6, se muestra igualmente las correlaciones encontradas entre algunos puntos de proteínas y la motilidad espermática (Tablas 5 y 6). Se determinó igualmente, que existen correlaciones (resultados no mostrados) entre puntos de proteína de diferentes pesos moleculares. Tal es el caso de dos puntos de proteína, en plasma seminal de toros Sanmartinero, con puntos isoelectricos de 5.5 y 5.7 y pesos moleculares de 16.2 y 15.3 respectivamente, los cuales presentaron una correlación alta (0.99 $p<0.05$) entre ellos.

Tabla 5. Coeficientes de correlación entre puntos de proteína y parámetros de calidad seminal en plasma de toros Sanmartinero.

Coeficientes de correlación (r)			
Punto de proteína (MW y pl)	Viabilidad (%)	Motilidad (%)	Conc. espermática
(23.22-3.59)			0.91*
(17.40-5.01)		0.42*	
(45.01-4.94)			0.66*
(13.52-5.17)		0.40*	0.48*
(44.70-5.20)		-0.58*	
(16.20-5.5)	0.63**		
(14.93-5.86)	-0.42*		
(76.0-6.00)			0.58*
(14.08-6.08)			0.49*
(32.06-6.11)		0.96*	
(42.20-6.13)		-0.85*	-0.94*
(75.60-6.07)		0.52*	
(60.66-6.33)			0.87**
(17.24-9.02)		0.53*	0.58*
(10.55-9.80)	-0.51*		

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

Tabla 5. Coeficientes de correlación entre puntos de proteína y parámetros de calidad seminal en plasma de toros Cebú Brahman

Coeficientes de correlación (r)			
Punto de proteína (MW y pl)	Viabilidad (%)	Motilidad (%)	Con. espermática
(12.34-4.53)		0.98**	
(28.70-4.08)	0.41*		
(13.23-4.94)	-0.41*		
(28.50-5.12)			0.50*
(28.90-5.41)		0.87*	
(13.89-5.73)		-0.64*	
(14.75-5.71)			-0.76*
(15.04-6.09)		0.45*	
(14.59-6.64)		0.68*	
(69.91-6.34)	0.56*		
7501 (24.77-7.01)		0.62*	

*p<0.05 **p<0.001

Es posible que el punto de 16.2 kDa y pl de 5.5, 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, 2009). Entre otras funciones, se ha encontrado que las proteínas BSP, 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 el momento de la ovulación, regulando 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 BSP 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, específicamente a las proteínas BSP, facilitando la formación de los reservorios oviductales.

De otro lado, en el mapa proteómico de toros Sanmartinero, el punto de proteína con peso molecular de 13.52 y pl 5.17, que probablemente también pertenezca a la familia de las proteínas BSP, presentó 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.

Contrario al plasma seminal de Sanmartinero, un punto de proteína de 13.2 kDa y pl 4.9, presentó correlación negativa ($r= 0.41$ $p<0.05$) con la viabilidad espermática en semen de toros Cebú Brahman. Este punto al parecer corresponde a la BSP A3. Al respecto, 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.

En conclusión se puede decir que la electroforesis bidimensional es una potente herramienta para separar proteínas de soluciones complejas como el plasma seminal. En esta investigación se evidenció, que tanto en el plasma seminal de toros Sanmartinero, como en el plasma de los toros Cebú Brahman, existen proteínas específicas que se relacionan con las variables de calidad seminal, ya sea de forma positiva o de forma negativa, y que muy posiblemente existan interacciones entre estas, lo cual aseguraría el normal funcionamiento del espermatozoide. La mayor cantidad de puntos de proteína encontrados en el plasma seminal de toros Sanmartinero, la mayor concentración de ciertas proteínas y su mayor correlación con las variables de calidad seminal, podría explicar la fertilidad superior de esta raza, y justifica la realización de nuevas investigaciones, que permitan corroborar estos resultados.



Toro Sanmartinero



Toro Cebú Brahman

CAPITULO 3. LA ADICIÓN DE PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL, UNA ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA VIABILIDAD POST-DESCONGELACIÓN

El plasma seminal contiene proteínas funcionales específicas que han permitido incrementar los porcentajes de espermatozoides viables post-descongelación (Barrios, 2000; Moura, 2006). Los estudios en la especie ovina, evidenciaron la presencia de proteínas que revierten los daños ocasionados a la membrana de espermatozoides expuestos a choques térmicos por bajas temperaturas (Ollero y col., 1997). De tal forma, que existe la posibilidad de 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 Sanmartinero y Cebú Brahman al ser incubados con fracciones que contienen proteínas específicas de plasma seminal.

• Metodología

• Separación de las proteínas del plasma seminal por cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño es una técnica de separación basada en las diferencias entre los pesos moleculares de las sustancias a separar (enzimas, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, hormonas y otras macromoléculas biológicas), donde las moléculas de mayor tamaño eluyen primero y las de menor tamaño se retrasan (Figura 10)

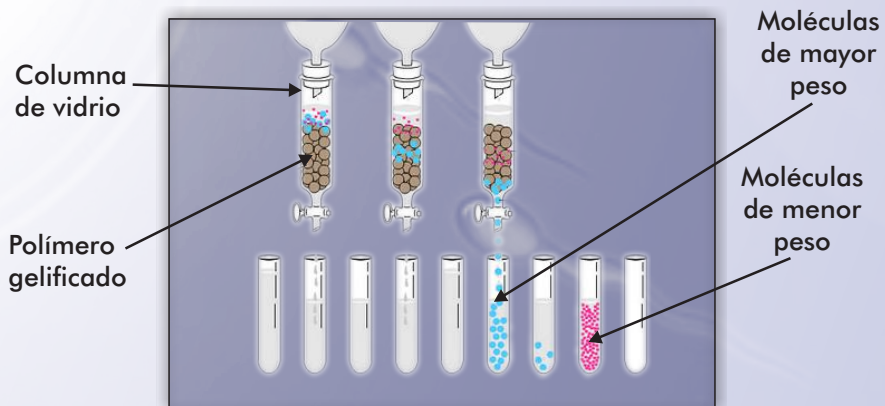


Figura 10. Ilustración del fundamento de la cromatografía de exclusión

El proceso cromatográfico utiliza como medio de separación un polímero constituido por partículas pequeñas en estado de gel, que se encuentran empaquetadas en una columna de vidrio. Las moléculas a separar son transportadas a través de un líquido que retarda el avance de las moléculas a través del lecho, actuando como una fuerza de resistencia. El polímero gelificado presenta un entrecruzamiento que ocupa un espacio determinado y deja zonas libres (poros). Las moléculas grandes no pueden penetrar esta zona mientras las pequeñas sí, esto hace que las moléculas pequeñas tengan acceso a los poros de la matriz, por lo que las moléculas grandes tienen más velocidad y fluyen más rápido.

En la investigación adelantada, el plasma seminal se obtuvo de toros Cebú y Sanmartinero por centrifugación. Posteriormente, el plasma seminal se concentró mediante microconcentradores ultra Amicón de 3 kDa (Millipore®), que dejan pasar proteínas de hasta 3KDa.

La matriz polimérica usada en la cromatografía, fue Sephacril S-100 y el móvil fue buffer fosfato 0.05 M pH 8.0 empacado en una columna de 100 cm de largo y 1 cm de diámetro interno, con un volumen total de 79 mL, para coleccionar fracciones separadas en tubos de 10 mL a flujo de 0.5 mL/minuto. Se coleccionaron 50 fracciones en total, cada fracción con volumen de 4 mL, las cuales se sometieron a liofilización durante 24 horas.

• **Adición de las proteínas separadas a semen criopreservado**

La criopreservación de los espermatozoides, se realizó con dos diluyentes diferentes: Citrato-fructosa con yema de huevo (CFY) y el medio comercial para congelación (Bioxcell®, IMV Francia). Las fracciones cromatográficas, que contenían las proteínas de interés, se adicionaron a 1 millón de espermatozoides descongelados, en dosis de 0.5, 1, 1.5 y 2 mg del concentrado de proteínas resuspendidas en medio MHTF. Se usaron así mismo, dos controles: MHTF sin proteínas como control negativo y plasma seminal completo como control positivo, para un total de 5 tratamientos. Posteriormente, los tratamientos se colocaron en incubación a 37 °C durante 1 hora, al cabo de la cual, se determinó la viabilidad espermática mediante el método del ioduro de propidio-diacetato de carboxifluoresceína (Harrison y Vickers, 1990) (Figura 11).

El efecto de reversión del daño en la membrana de los espermatozoides se determinó mediante la fórmula:

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

Dónde:

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

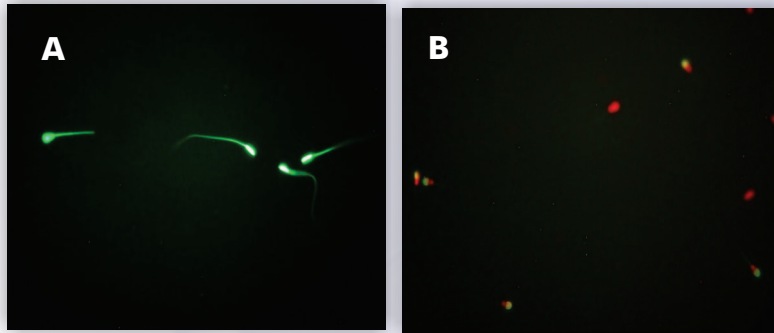


Figura 11. Espermatozoides teñidos con Diacetato de Carboxifluoresceína y Ioduro de propidio (A). Espermatozoides con membrana espermática íntegra (viables), (B) Espermatozoides con membrana espermática dañada (no viables).

• Resultados

• Cromatografía de exclusión y separación de fracciones

Por estudios previos, se estableció que las proteínas del plasma seminal de toros Sanmartinero y Cebú tienen pesos moleculares entre 9.2 y 78.5 kDa. Así mismo se determinó que ciertas proteínas de bajo peso molecular, presentaban correlación importante entre la cantidad relativa (medida en porcentaje) y la viabilidad espermática ($r= 0.64$, $p<0.001$). En razón a esta relación, se decidió separar mediante exclusión por tamaño, la fracción cromatográfica que contenía estos puntos de proteína (Figura 12), lo cual se comprobó, al realizar la electroforesis bidimensional de la misma (Figura 13).

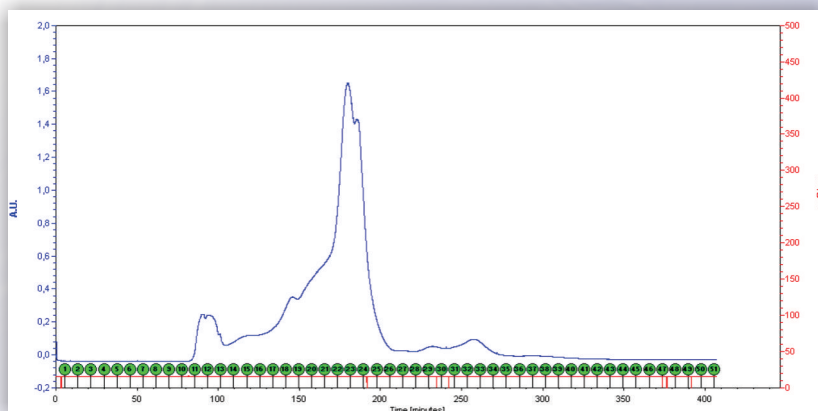


Figura 12. Cromatograma del fraccionamiento de proteínas del plasma seminal mediante cromatografía de exclusión por tamaño se señala el pico más abundante que comprende las fracciones 20 a 25.

El gel en dos dimensiones demostró que las dos bandas de 14 y 16 kDa, mostradas en los geles 1D (trabajo anterior), representan más de una sola proteína específica.

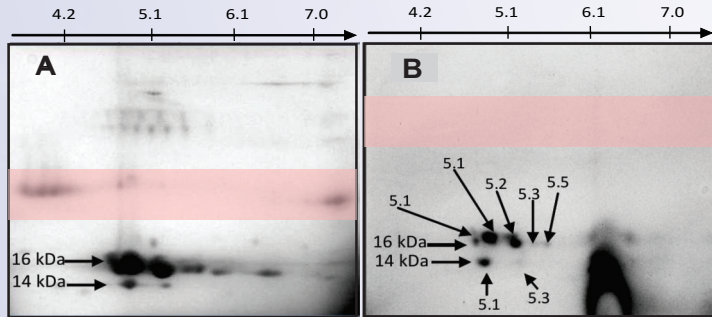
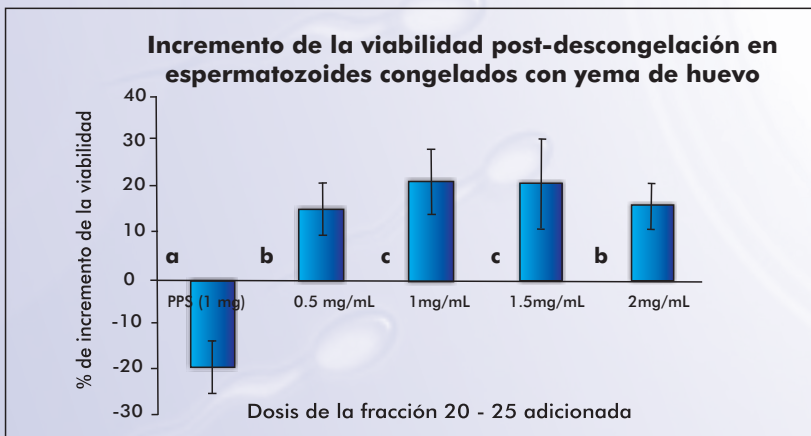


Figura 13. Electroforesis bidimensional de plasma seminal de Sanmartinero con rango de separación de pH 4 a 7. (A) Gel bidimensional de plasma seminal completo, (B) Gel bidimensional de la fracción 20, se señalan los pesos moleculares aproximados y los puntos isoeléctricos de los 7 puntos presentes en las bandas de 14 y 16 kDa.

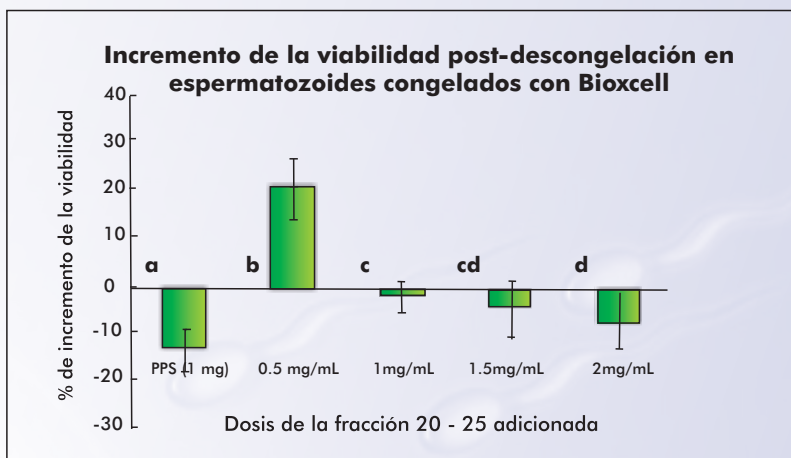
• Adición de las fracciones cromatográficas

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, se evidenció un aumento en el porcentaje de espermatozoides viables con respecto a las muestras control, que no contienen proteínas adicionadas (Figura 14, 15).



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

Figura 14. Incremento porcentual de la viabilidad post-descongelación de 1 millón de espermatozoides criopreservados con yema de huevo.



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

Figura 15. Incremento porcentual de la viabilidad post-descongelación de 1 millón de espermatozoides criopreservados con Bioxcell® comercial.

Los espermatozoides incubados (criopreservados con yema de huevo) con 1.0 y $1.5 \text{ mg}/10^6 \text{ spz}$ de la fracción cromatográfica, presentaron un incremento en el porcentaje de espermias viables de $22.0 \pm 6.5\%$ con respecto a aquellos a los que no se les adicionó. En tanto que con 0.5 mg de la fracción, se obtuvo un incremento de $25.2 \pm 5.3\%$ en el porcentaje de espermatozoides viables, cuando estos se criopreservaron con Bioxcell, dosis mayores de la fracción parecen tener un efecto nocivo.

Al evaluar el efecto de la adición de la fracción de proteínas (cromatográfica) en la reversión del daño en la membrana espermática, se corroboró que con una dosis de $0.5 \text{ mg}/10^6 \text{ spz}$, se presenta los mayores porcentajes de reversión, cuando estos han sido criopreservados con el medio Bioxcell (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de espermatozoides viables en semen fresco y descongelado (criopreservado con medio Bioxcell) e incubado con diferentes dosis de la fracción cromatográfica.

Porcentaje de espermatozoides viables (%)						
Semen fresco	Control	Proteínas plasma seminal	$0,5 \text{ mg}/10^6 \text{ spz}$	$1 \text{ mg}/10^6 \text{ spz}$	$1,5 \text{ mg}/10^6 \text{ spz}$	$2 \text{ mg}/10^6 \text{ spz}$
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 se realizó en aquellos espermatozoides que fueron criopreservados en medio con yema de huevo, el porcentaje de reversión del daño es de 15,23%, y los únicos tratamientos que tienen un efecto de reversión del daño, son las dosis comprendidas entre 1.0 y 2.0 mg/10⁶ espermatozoides (Figura15).

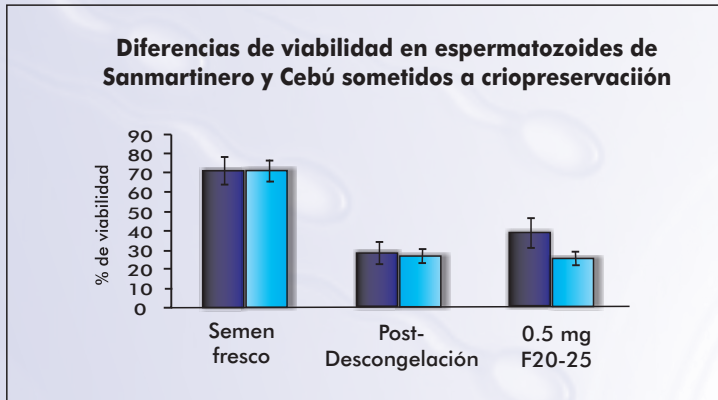


Figura 15. Porcentajes de viabilidad espermática en semen de toros de las razas Sanmartinero y Cebú Brahman en semen fresco, descongelado e incubado con una dosis de fracción 20-25 de 0.5 mg/10⁶ espermatozoides.

En trabajos del nivel internacional, se ha reportado la presencia de bandas de proteína con pesos moleculares (14 y 16 kDa) similares a las encontradas en la fracción cromatográfica objeto del presente trabajo, y que podrían coincidir con las proteínas que se conocen como BSP. 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 decapacita al espermatozoide y previene la capacitación prematura del mismo.

Se sabe que las BSP comprenden el grupo de proteínas más abundantes en el plasma seminal bovino (Manjunath, 1993; Therien, 1997; Therien y Manjunath, 1999; Swamy, 2004; Moura, 2006), 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%) lo cual también se evidenció en esta investigación. Sin embargo, solo hasta cuando se realice la secuenciación de las proteínas presentes en la fracción cromatográfica que se analizó, se podría establecer que corresponden a las BSP.

• Conclusiones

Los resultados de esta investigación evidenciaron la posibilidad de poder utilizar proteínas del plasma seminal, para revertir el daño ocasionado a la membrana del espermatozoide durante el proceso de congelación, y muy posiblemente su utilización como aditivo a los medios de congelación para prevenir el daño provocado por este proceso. Igualmente se observó una clara interacción del medio que se utilizó en la criopreservación de los espermatozoides, sobre el efecto de reversión del daño de la fracción de proteínas empleada.

Se evidenció un claro efecto positivo de la adición de la fracción de proteínas, en la recuperación del daño de la membrana espermática, ocasionado por la criopreservación, cuando se adicionó a espermatozoides de toros Sanmartinero; mientras que para espermatozoides de toros Cebú, el efecto no es suficiente para considerarlo significativo, justificando la realización de nuevas investigaciones, con el fin de lograr conseguir proteínas que puedan servir para ambas razas, o encontrar proteínas específicas para cada raza.

CAPÍTULO 4. PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL

Las proteínas de la superficie espermática juegan un papel crucial en la fecundación y pueden estar implicadas en multitud de funciones relacionadas como: la adquisición de la motilidad, la unión a las células del epitelio oviductal en el tracto reproductor femenino, la capacitación y subsiguiente reacción acrosómica, la unión a las células del cummulus o a la zona pelúcida y su penetración, y por último, la unión con la membrana plasmática del ovocito y su fusión. Estas proteínas presentan una gran diversidad tanto en su lugar de síntesis, como en su lugar de asociación a la membrana, y en su función específica. Entre las funciones que pueden desempeñar se encuentran las de transportadores, canales, enzimas, receptores y elementos del citoesqueleto (Figura 16).

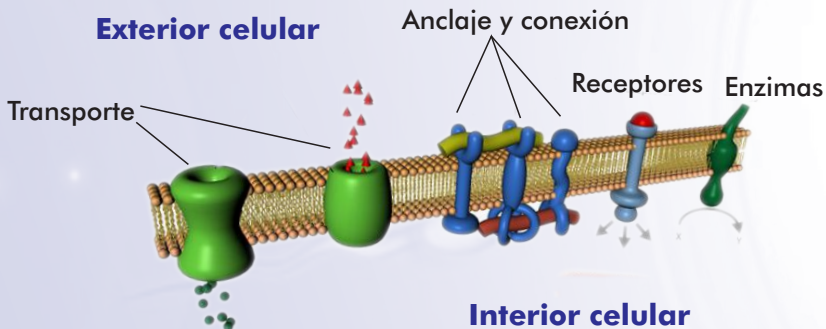


Figura 16. Esquema de las proteínas y su función en membrana celular (adaptado de www.educared.org)

Las proteínas presentes en la membrana se clasifican en integrales y periféricas. Las integrales son muy importantes en el transporte y la transducción de señales, mientras que las periféricas están asociadas a la superficie, donde forman un esqueleto de membrana mediante interacciones con proteínas integrales específicas (Marchesi, 1985). Esto conlleva el mantenimiento de la forma celular y define la distribución de las proteínas integrales.

Se conoce que la composición proteica de la membrana del espermatozoide está sujeta a constantes modificaciones, de tal forma que las proteínas sintetizadas durante la espermiogénesis, pueden perderse o enmascararse en el proceso de maduración a lo largo del tracto reproductor masculino, ser

reemplazadas por otras nuevas, reorganizarse o cambiar de lugar. No debe olvidarse igualmente que otras muchas pertenecen al plasma seminal secretado por las glándulas accesorias y pasan a formar parte del espermatozoide tras la eyaculación.

Otro aspecto importante a considerar es que durante su tránsito en el tracto reproductor femenino, pueden modificarse o eliminarse, como en el caso de algunos factores descapacitantes (Carballada y Esponda, 1998). Algunas proteínas tienen la función de estabilizar la membrana hasta el momento adecuado, mientras que otras contribuyen a la pérdida de la membrana, es decir, a la exocitosis. Del equilibrio entre la acción de estas proteínas, depende que la capacitación se produzca en el momento oportuno (De Jonge, 1999).

Igualmente se ha descrito en la superficie espermática de bovino, un receptor del factor I de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I), que estimula la motilidad y está implicado en el proceso de fertilización (Henricks, y col., 1998).

En cuanto a las proteínas implicadas en las interacciones espermatozoide-ovocito (Figura 17), se ha propuesto la existencia de un gran número de proteínas espermáticas que actúan como receptores específicos de las glicoproteínas de la zona pelúcida del ovocito (ZP). Dichas proteínas se denominan genéricamente proteínas de unión al ovocito (eggbinding proteins o EBPs) y pueden clasificarse en dos grupos, según estén implicadas en la unión primaria o secundaria con la zona pelúcida .

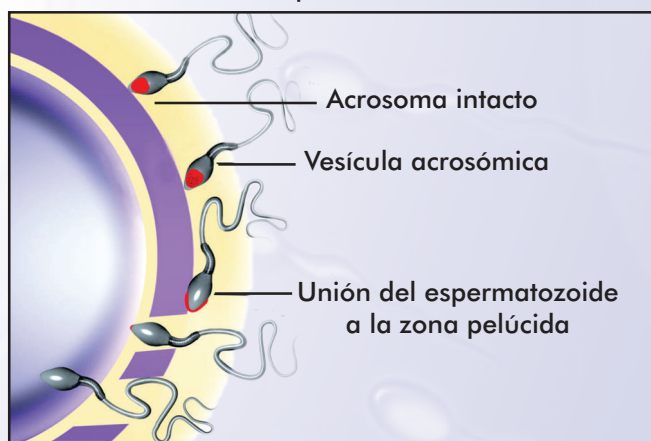


Figura 17. Unión del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito

Las implicadas en la unión primaria se localizan en el segmento principal de la membrana plasmática, recubriendo el acrosoma, y se pierden como consecuencia de la exocitosis acrosomal. Tras la capacitación aumenta la

afinidad de unión a la ZP de los receptores implicados en la unión primaria. La unión a la ZP conduce instantáneamente a la reacción acrosómica (Fazeli y col.,1997), por lo que se ha propuesto que algunas de estas proteínas integrales implicadas en la unión primaria, poseen un dominio extracelular que es el sitio de unión a la ZP, y un dominio citosólico, que actúa como activador de las vías de transducción de señales intracelulares en la reacción acrosómica (Brewis y Wong, 1999).

Se ha descrito que proteínas como las ZRK (zona receptor kinase), zonadhesinas y otros compuestos desconocidos capaces de atravesar la membrana podrían formar un receptor multimérico, que tras la unión a la zona pelúcida inicie la agregación de las moléculas de transducción del complejo receptor, disparando las rutas que conducen a la reacción acrosómica (Florman y col.,1998).

La unión secundaria a la zona pelúcida ocurre tras la reacción acrosómica. Las EBPs implicadas en esta unión secundaria han dejado la superficie y se encuentran ahora en la vesícula acrosomal, y sólo estarán expuestas a la interacción con la ZP tras la dispersión de la matriz acrosomal. Entre ellas estarían la PH-20 en cobaya (Phelps y Myles, 1987) y hombre (Lin, y col., 1993), la proacrosina-acrosina (Töpfer-Petersen,1996; Howes y Jones 2002) y la Sp 17 en conejo (Richardson y col.,1994).

Algunas de estas proteínas, además de actuar como receptores para la interacción secundaria, poseen diversas actividades enzimáticas. Es el caso de la proteína PH-20, localizada en la membrana de varias especies que presenta actividad hialuronidasa, para la digestión de la envoltura del ovocito. Esta proteína migra de la región postacrosomal hacia la membrana acrosomal interna tras la reacción acrosómica (Myles y Primakoff, 1984), quedando expuesta, por lo que podría estar implicada en la unión a la ZP (Phelps y Myles, 1987) o en la fusión con el ovocito. Existen homólogos en el bovino (Lancette y col., 2001).

Otro ejemplo es la acrosina, que además de contribuir con su unión contribuye a que el espermatozoide hiperactivado permanezca unido a la ZP, posee actividad enzimática para la digestión de dicha matriz. Existen asimismo, en la membrana espermática, proteínas relacionadas directamente con la fusión con el ovocito.

El espermatozoide, una vez ha atravesado la ZP, se une al oolema por su región ecuatorial. Por ello, aquellas proteínas relacionadas con la fusión se localizan en el segmento ecuatorial de la membrana espermática. Es el caso de la fertilina, también llamada PH-30, localizada en el ápice acrosomal en cobaya (Yuan, Primakoff y col.,1997) y en el segmento ecuatorial en ratón, donde también aparece en la membrana acrosomal interna.

• Obtención de las proteínas de membrana

El primer punto a tener en cuenta en el momento de obtener las proteínas de membrana, es garantizar una cantidad suficiente de espermatozoides, y así obtener suficiente proteína, para esto existen varios métodos de selección de espermias. En nuestro caso, se empleó el método de nadado hacia arriba o Swim up (Figura 18), que permite seleccionar las mejores células. En esta investigación se empleó un mínimo de 23×10^6 espermatozoides con lo cual se garantiza la suficiente cantidad de proteína para realizar la electroforesis bidimensional.

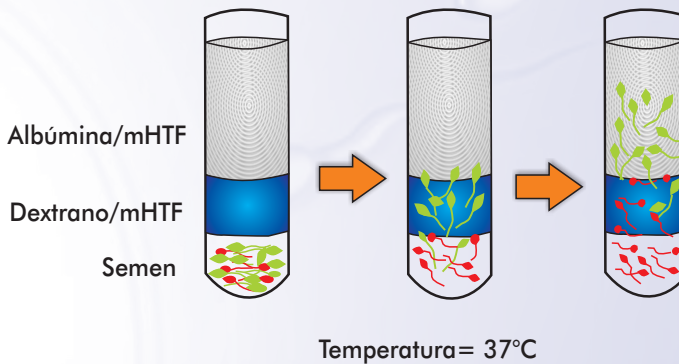


Figura 18. Método de Swim up para selección de espermatozoides

Una vez se tuvo el número de espermias necesario, se procedió a la extracción de las proteínas de membrana, para lo cual es conveniente aclarar, que es un proceso laborioso y de gran rigurosidad, para alcanzar el objetivo. En el procedimiento se emplean una serie de metodologías tendientes a tener una muestra óptima, que permita adelantar el proceso de separación electroforética de las mismas.

En la preparación de la muestra, las proteínas se deben desnaturalizar, desagregar, reducir y solubilizar, con el propósito de alcanzar una completa destrucción de las interacciones moleculares, y asegurar que cada punto represente un polipéptido individual (Gorg y col., 2004). Si se quiere obtener la máxima ventaja de la alta resolución obtenida con la 2D-PAGE, los experimentos deben realizarse bajo condiciones desnaturalizantes (Molloy, 2000).

Hay tres pasos fundamentales en la preparación de la muestra: la lisis celular, la inactivación o eliminación de las sustancias que interfieren con el desarrollo del proceso, y la solubilización de las proteínas. Pasos adicionales

en la preparación de la muestra pueden mejorar los resultados finales, pero cada paso adicional puede provocar pérdidas de proteína, resultando una incompleta representación electroforética de las proteínas de la muestra (Berkelman y Stenstedt, 1998)

La destrucción celular puede alcanzarse por lisis osmótica, por el procedimiento de congelación-descongelación, lisis con detergentes, lisis enzimática de la pared celular, sonicación, alta presión, cavitación con nitrógeno o con un homogenizador con cuchillas en rotación. Durante o después de la lisis celular, pueden aparecer compuestos tales como: enzimas proteolíticas, sales, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y/o proteínas altamente abundantes, los cuales interfieren con la solubilización de la muestra, o con el proceso de electroforesis, especialmente en la etapa de isoelectroenfoque, y por tanto deben eliminarse o inactivarse (Gorg y col., 2004).

En esta investigación se empleó un procedimiento químico, que utilizó como detergente el n-Octyl L-Glucopiranoside. El medio de extracción utilizado se basa en el descrito por Pixtón y col., 2004 y modificado para semen humano por Martínez-Heredia, J 2006, el cual tiene la siguiente composición: 7 M urea, 2M thiourea, 1% CHAPS, 1% n-Octyl L-Glucopiranoside, 0.5% IPG buffer, 18 mM DTT, 2.4 μ M PMSF y 0.005% de azul de bromofenol. La utilización de este método permitió obtener solo proteínas de membrana, debido a que el n-Octyl L-Glucopiranoside, es un detergente suave.

• Separación electroforética de las proteínas de membrana

La separación electroforética de las proteínas se realizó tanto en una (SDS-PAGE) como en dos dimensiones (2D-PAGE), de acuerdo a los protocolos de Laemmli (1970) y O´Farrel (1975) respectivamente. Tanto el gel de poli-acrilamida empleado en la SDS-PAGE, como en la segunda dimensión de la 2D-PAGE, se realizó en gradiente de concentración lineal de 8-12%.

• Electroforesis unidimensional

Los resultados de la SDS-PAGE, evidenciaron la presencia de 36 bandas de proteína tanto en la membrana de toros Sanmartinero, como en toros Cebú Brahman. Los pesos moleculares de las bandas de proteína estuvieron entre 11 y 341 kDa (Figura 19).

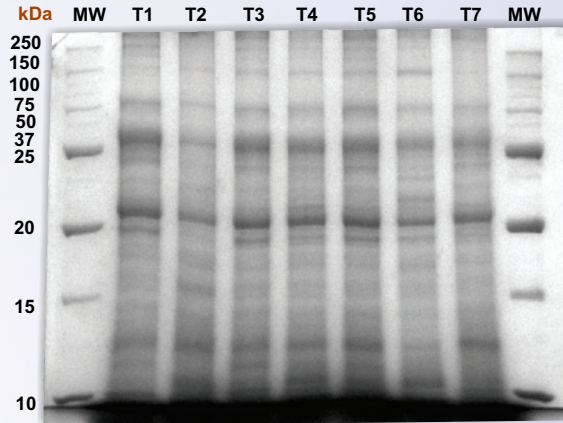


Figura 19. Bandas de proteína de la membrana del espermatozoide de toros Sanmartinero.

En la Tabla 7 se relacionan las bandas de proteína que se encontraron en la mayoría de las muestras seminales, de los toros objeto de la investigación. Las demás bandas de proteína no se tuvieron en cuenta en el análisis, debido a la poca frecuencia de presentación, razón por la cual no se referencian en la tabla.

Un dato a tener en cuenta, es que al analizar la imagen de los geles, se evidencia que no todos los toros presentan el mismo patrón de bandeo, ni el mismo número de bandas de proteína. Tal es el caso de la banda de proteína de peso molecular de 217.2 kDa, la cual aparece con más frecuencia en los toros Sanmartinero, pero en 4 de ellos desaparece en el tercer muestreo; mientras que en los toros Cebú, solo aparece en el primer muestreo de nueve de ellos.

Se evidencia en la Tabla 7, la existencia de diferencias estadísticas en la concentración de 7 bandas de proteína, con una concentración mayor en los toros Cebú

En la raza Sanmartinero se encontró que las bandas de proteína de 136.8 y 19.7 kDa, correlacionaron negativamente ($r=-0.51$ y $r=-0.55$; $P<0.05$ y $p<0.001$ respectivamente) con los valores de viabilidad espermática. En tanto, la banda de proteína de 21.9 kDa, correlacionó positivamente ($r=0.42$; $p<0.05$) con la motilidad progresiva.

En la raza Cebú, las bandas de proteína de 22.3, 19.7, 18.7 y 12.8 kDa, correlacionaron negativamente ($r= -0.54, -0.52, -0.61$ y -0.65 respectivamente; con $p<0.05$ para las dos primeras y $p<0.01$ para las dos últimas) con el porcentaje de espermias viables. La proteína de 15.4 kDa,

correlacionó ($r=0.47$, $p<0.01$) con la motilidad progresiva; mientras que la proteína de 24.1 kDa, correlacionó negativamente ($r=-0.57$, $p<0.01$) con la concentración de espermatozoides de la muestra.

Tabla 7. Concentración de las bandas de proteína de la membrana de los espermatozoides de toros Sanmartinero y Cebú Brahman.

Peso Molecular	RAZA	
	CEBÚ	SANMARTINERO
272.4	4.123 ± 2.346*	2.637 ± 0.612*
136.8	5.838 ± 3.064*	4.488 ± 1.690*
49.1	4.643 ± 1.829	5.628 ± 2.403
37.7	6.081 ± 2.233	4.906 ± 1.918
36.0	6.860 ± 2.446	4.804 ± 1.850
34.2	5.664 ± 1.700	5.234 ± 1.937
32.3	5.522 ± 2.577	5.928 ± 3.809
30.8	5.410 ± 1.956	5.414 ± 2.631
25.7	5.350 ± 1.923	5.041 ± 1.593
24.1	5.564 ± 2.837	4.604 ± 1.845
22.3	6.207 ± 3.018*	4.196 ± 1.166*
21.9	4.949 ± 2.301	4.630 ± 1.513
20.3	6.000 ± 2.335**	4.455 ± 1.495**
19.7	5.712 ± 3.408	4.565 ± 1.594
18.7	5.716 ± 2.436	4.537 ± 1.538
18.9	6.550 ± 2.470	5.682 ± 2.449
17.7	5.061 ± 2.027*	3.942 ± 1.059*
17.3	5.698 ± 2.512**	3.798 ± 1.531**
16.6	5.090 ± 2.802	5.110 ± 2.133
15.8	4.411 ± 1.880	5.113 ± 1.730
15.4	4.722 ± 2.258	4.226 ± 1.522
14,5	3.801 ± 1.676	4.297 ± 1.470
12.8	4.363 ± 2.474	3.877 ± 1.605
11,7	4.857 ± 2.399*	3.510 ± 1.443*

* $P<0.05$ ** $p<0.01$

Se puede observar un mayor número de proteínas que se relacionan negativamente con la integridad de la membrana, en Cebú, lo cual podría explicar en cierta forma la menor viabilidad espermática del semen de esta raza con respecto a los valores de viabilidad encontrados en toros Sanmartinero.

En toros Sanmartinero, la proteína de 136.8 kDa que correlacionó negativamente con el porcentaje de espermias viables, podría corresponder a una desintegrina, la cual es importante en la unión esperma-oocito; mientras que la proteína de 19.7, que también correlacionó negativamente con la viabilidad, podría ser una de las BSP, proveniente del plasma seminal. Se sabe que uno de los papeles de la BSP, es provocar la salida de colesterol y de esta forma desestabilizar la membrana, y provocar la reacción del acrosoma, lo cual explicaría esta correlación. Es posible además, que la acción de la BSP de desestabilizar la membrana espermática, provoque la exposición de un ligando, que reconozca integrinas del óvulo, facilitando la unión de las dos células, y por consiguiente la fecundación.

En cuanto a la proteína de 21.9 kDa, que correlacionó con la motilidad espermática, es posible que corresponda con una proteína que se encuentra a lo largo de la cola del espermatozoide, cuya función está relacionada con los cambios rápidos en la motilidad del esperma. Su acción se realiza por la fosforilación mediada por una proteinquinasa.

En los toros Cebú, las proteínas de 18.7, 19.7 y 22.3 kDa, que correlacionaron negativamente con la viabilidad espermática, posiblemente correspondan a las BSP, que como ya se explicó desestabilizan la membrana y provocan la reacción acrosómica. De otra parte, la proteína de 15.4 kDa que correlacionó positivamente con la motilidad progresiva, podría corresponder a una proteína que se ubica en la parte basal de la cola del espermatozoide, y su acción podría ser mediante una enzima protein-tirosin-quinasa, a través de la fosforilación de la proteína en los residuos de tirosina.

Finalmente en la membrana del espermatozoide de los toros Cebú Brahman, se encontró una proteína (24.1 kDa) que correlacionó negativamente con la concentración espermática, posiblemente esta proteína corresponda a una proteína que se ha vinculado a los procesos de espermatogénesis.

• **Electroforesis bidimensional**

En este procedimiento de separación se emplearon tiras de poliacrilamida de 7 cm, con gradiente de pH inmovilizado en un rango de pI de 3 a 10. La separación de las proteínas tiene en cuenta dos características importantes de la proteína, su punto isoeléctrico y su peso molecular, por lo que la información que se obtiene es mucho más significativa.

Al momento de elaborar esta publicación los resultados no estaban concluidos, razón por la cual solo se puede decir que en el análisis de los mapas proteómicos, se detectaron entre 200 y 400 puntos de proteína.

La figura 20 muestra los mapas proteómicos bidimensionales de toros de las razas Sanmartinero y Cebú Brahman.

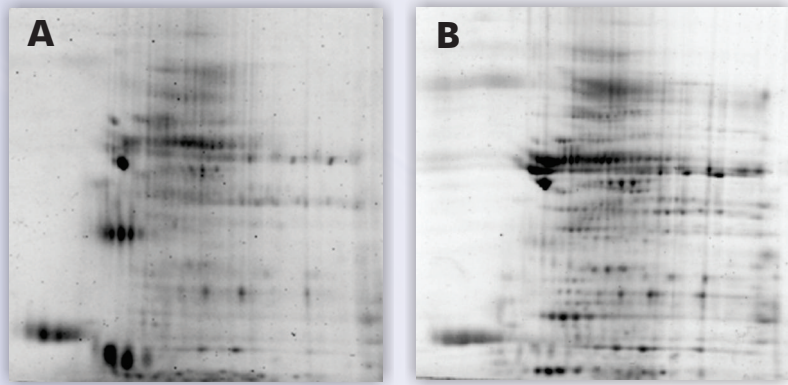


Figura 20. Mapa proteómico bidimensional de toros Cebú Brahman (A) y toros Sanmartinero (B). Se aprecia un mayor número de puntos de proteína en el mapa de los toros Sanmartinero.

• Conclusiones

El estudio de las proteínas de la membrana del espermatozoide bovino, permite explicar con gran detalle aspectos de la fisiología celular, a nivel molecular. Esta investigación evidenció relaciones entre diversas proteínas y funciones importantes de la célula espermática de ambas razas. Así mismo se establecieron diferencias en el patrón proteínico entre las mismas, y se empezó a establecer la razón de las diferencias en el comportamiento reproductivo de las razas investigadas. Los resultados aquí presentados justifican la realización de futuras investigaciones que lleven a establecer marcadores moleculares de fertilidad de los reproductores, con miras a elevar los índices de eficiencia reproductiva de los hatos bovinos del país.

BIBLIOGRAFÍA

Al Naib, J.P.; Hanrahan, P.; Lonergan, S.F. 2011. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology* 76(1):161-167.

Amann, R.P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J. Androl.* 2 (10), 89-98.

Anzar, M.; Hassan, M.M.; Graham, E.F.; Deyo, R.C.M.; Singh, G. 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology.* 2 (36), 307- 317.

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

Berkelman, T.; Stenstedt, T. 1998. 2-D electrophoresis. Using immobilized pH gradients: Principles and Methods., Amersham Pharmacia Biotech: 1-50.

Brewis, I. A. y Wong, C.H. 1999. Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev. Reprod* 4: 135-142.

Brillard, J.P.; McDaniel, G.R. 1985. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poult. Sci.* 64, 155–158.

Calvete, J.; Varela, P.; Sanz, L.; Romero, A. 1996. A Procedure for the Large-Scale Isolation of Major Bovine Seminal Plasma Proteins. *Protein Expression and Purification.* 8: 48–56.

Carballada, R. y Esponda, P. 1998. Binding of seminal vesicle proteins to the plasma membrane of rat spermatozoa in vivo and in vitro. *International Journal of Andrology* 21: 19-28.

Cardozo, J.A.; Fernandez-Juan, M.; Cebrian-Pérez, JA.; Muño-Blanco, T. 2006. Identification of RSVP14 and RSVP20 Components by Two-dimensional Electrophoresis and Western-blotting. *Reproduction in Domestic Animals.* 10: 15-21

Colas, G. 1981. Seasonal variations of sperm quality in adult Ile-de-France rams. II. Fertilizing ability and its relation to qualitative criteria in vitro]. *Reprod. Nutr. Dev.* 21(3): 399-407

De Jonge, C. 1999. Attributes of fertile spermatozoa: An update. *J. Androl.* 20(4): 463-473.

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

El-Ghobashy, A. A.; West, C.R. 2003. The human sperm head: a key for successful fertilization. *J. Androl.* 24(2): 232-8.

Ericsson, S.A.; D. L. Garner.; D. Redelman.; K. Ahmad. 1989. Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. *Gamete Res.* 22(4): 355-368

Evenson, D.P.; Parks, J.E.; Kaproth, M.T.; Jost, L.K. 1993. Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *J. Dairy Sci.* 76, 86-94

Fazeli, A.; Hage, W.J.; Cheng, F.P.; Voorhout, W.F.; Marks, A.; Bevers, M.M.; Colenbrander, B. 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol. Reprod.* 56: 430-438.

Fernandez, J.; Gallego, M.; Barrios, B.; Cebrian-Pérez, JA. 2006. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. *Reproduction.* 132: 588-595

Flesch, F.M.; B.M. Gadella. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Bioch. Biophys. Acta;* 1469: 197-235.

Florman, H.M.; Arnoult, C.; Kazam, I.G.; Li, C., y O'Toole, C.M.B. 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol. Reprod.* 59, 12-16

Garner, D.L.; Johnson, L.A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod;* 53:276-84.

Garner, D.L.; Pinkel, D.; Johnson, L.A.; Pace, M.M. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 34(1): 127-38.

- Gorg, A.; Weiss, W.; Dunn, M.J. 2004.** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4(12): 3665-85.
- Graham, J.K. 1996.** Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* 12, 119-130.
- Gravance, C.G.; Vishwanath, R.; Pitt, C.; Casey, P.J. 1996.** Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology.* 46, 1205-1215.
- Guérin, Y. 1990.** Méthodes de conservation de la semence ovine. *El. & Ins.* 236: 3-14.
- Gwathmey, T. M. 2003.** 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.* 69: 809-815
- Harrison, RA.; Vickers,S. 1990.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility.* 88: 342-353.
- Henricks, D. M.; Kouba, A.J.; Lackey BR.; Boone WR.; Gray, SLL. 1998.** Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: Influence on sperm motility. *Biol. Reprod.* 59(2): 330-337.
- Holt, W.V.; Van Look, J.W. 2004.** Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction.* 127, 527-535.
- Howes, L. y Jones, R. 2002.** "Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J. Reprod. Immunol* 53(1-2): 181-92.
- Ibrahim, N.M.; Romano,J.E.; Troedson, M.H; Crabo, B.G. 2001.** Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. *J. Androl.* 22(5): 863-77.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259): 680-5.
- Lalancette, C.; Dorval, V.; Leblanc, V.; Leclerc, P. 2001.** Characterization of an 80-kilodalton bull sperm protein identified as pH-20. *Biol. Reprod.* 65: 628-636.

Lin, Y.; Kimmel, L.H.; Myles, D.G.; Primakoff, P. 1993. Molecular Cloning of the Human and Monkey Sperm Surface Protein PH-20. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(21): 10071-10075.

Linford, E.; Glover, F.A.; Bishop, C.; Stewart, D.L. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.* 47 (2), 283-291.

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

Manjunath, P.; Lefebvre, J.; Wright, W. 2009. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biology of reproduction.* 80: p 394-397

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

Marchesi, V. T. (1985). Stabilizing infrastructure of cell membranes. *Annual Review of Cell Biology* 1: 531-561.

Martínez-Heredia, J.; Estanyol, J.M.; Ballescà, J.L.; Oliva, R. 2006. Proteomic identification of human sperm proteins. *6 (15):4356-4369*

Mocé, E.; Graham, J.K. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science;* 105: 104-118.

Molloy, M. P. 2000. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal. Biochem.* 280(1): 1-10.

Mortimer, S.T. 2000. CASA practical aspects. *J. Androl.* 21, 515-524.

Moura, A.; Hasan, K. 2006. Identification of proteínas in accessory Sex Gland Fluid associated with fertility indexes of dairy bulls. *Journal of Andrology.* 2006, 27, No 2: 201-212.

Muiño, R. 2008. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas Casa y citometría de flujo. Identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis doctoral, 157 p.

Myles, D. G.; Primakoff P. 1984. Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *J. Cell Biol* 99: 1634-1641

Rodríguez-Martínez, H. 2006. Can we increase the estimated value of semen assessment *Reprod in Dom. Anim.* 41:2–10.

Rodríguez-Martínez, H. 2000. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *Topics in Bull Fertility*. Chenoweth P.J. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York. USA

Rubio, J.; Quintero, A.; Gonzales, D. 2009. Effect of Cryopreservation on Integrity of Plasmatic and Acrosomal Membrane of Bulls Sperm. *Revista científica Universidad de Zulia*. 29 N 4: 382-389.

Saacke, R.G.; DeJarnette, J.M.; Bame, J.H.; Karabinus, D.S.; Whitman, S. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle. *Theriogenology* 51:117-128.

Saacke, R.G.; White, J.M. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*, pp: 22.

Salamon, S. 1987. Assessment of frozen-thawed semen. *Artificial Breeding of Sheep With Frozen Semen.*, W. M. C. M. S. A. D. Agric.: 5-11.

Souza, C.; Moura, A.; Killian, G. 2008. 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*. Vol 105, p 72–89

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

Therien I.; Moreau R.; Manjunath P. 1999. Bovine seminal plasma Phospholipidbinding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*. 61: 590–598

Thurston, L.M.; Watson, P.F.; Volt, W.V. 1999. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *J. Reprod. Fertil.* 117(2): 271-80.

Thurston, L.M.; Watson, P.F.; Mileham, A.J.; Volt, W.V. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22(3): 382-94.

Nagy, S.; Jansen, J.; Topper, E.K.; Gadella, B.M. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.* 68(5): 1828-35.

O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250(10): 4007-21.

Ollero, M.; García-López, N.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muño-Blanco, T. 1997. 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.* vol, 9, p 381-390.

Peña, A.I.; Quintela, L.A.; Herradón, P.G. 1998. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology* 50, 1211-1220.

Phelps, B.; Myles, D. 1987. The guinea pig sperm plasma membrane protein, pH-20, reaches the surface via two transport pathways and becomes localized to a domain after an initial uniform distribution. *Dev. Biol.* 123:63-72.

Phillips, N. J.; Evans, G.; McGowan, M.R. 2004. Measures used to assess frozen thawed semen in Australian livestock semen processing centres. *Aust Vet J.* 82 (5), 309-310

Primakoff, P.; Hyatt, H.; Tredick-Kline, J. 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell Biol.* 104: 141-149.

Richardson, R.T.; Yamasaki, N.; Holland, M.K. 1994. Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 165(2): 688-701.

Rigau, T.; Farré, M.; Ballester, J.; Mogas, T.; Peña, A.; Rodríguez-Gil, J.E. 2001. Effects of glucose and fructosa on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology.* 56, 801-815.

Rodríguez-Gil, J.E. 2006. Mammalian Sperm Energy Resources Management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod. Dom. Anim.* 41(2), 11-20.

Töpfer-Petersen, E. 1996. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Reprod. Domest. Anim.* 31: 93-100.

Valcárcel, A.; De las Heras, M.; Pérez, L.; Moses, D.; Baldasarre, H. 1994. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*; 41: 483 -489.

Yanagimachi R. 1994. *The Physiology of Reproduction*, Ed. J.D Neills.

Yeung, W. S.; Ng, E.H. 2000. Laboratory aspects of assisted reproduction. *Hong Kong Med J* 6(2): 163-8.

Yuan, R.; Primakoff, P.; Myles, D.G. 1997. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J. Cell Biol.* 37: 105-112.

Terminó de imprimirse
en enero de 2012



Teléfono: 8005848
Bogotá, D.C., Colombia

