Producción de Proteínas Recombinantes del Plasma Seminal Bovino de Interés en Procesos de Criopreservación Espermática

Ángela Patricia Brijaldo Villamizar

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLÉCULA Y BIOTECNOLOGÍA

POSTGRADOS

PAMPLONA

2022

Producción de Proteínas Recombinantes del Plasma Seminal Bovino de Interés en Procesos de Criopreservación Espermática

Ángela Patricia Brijaldo Villamizar

Facultad de Ciencia Básicas, Maestría en Biología Molecular y Biotecnología, Universidad de Pamplona, en Convenio con AGROSAVIA C.I Tibaitatá

Tesis presentada como Requisito para Optar al Título de Magister en Biología Molecular y Biotecnología.

DIRECTOR

PhD. Fabián Leonardo Rueda Alfonso

CODIRECTOR

PhD. Luis Fernando Arbeláez Ramírez

Pamplona

2022

Dedicatoria

Dedico esta tesis primero a mi poder superior que me dio la fuerza suficiente para no desfallecer

A mi familia pues sin ellos no lo habría logrado sus voces de aliento

A todas las personas que me apoyaron y han permitido que este proyecto se realice infinitas gracias y bendiciones.

Agradecimientos

A mis seres queridos y personas especiales. De ellos he tenido su mejor apoyo y mejores deseos.

Este nuevo logro es en gran parte a ustedes que al concluir esto que fue una tarea difícil que sin ustedes no se hubiera logrado. Quiero dedicarles este triunfo a ustedes seres amorosos y que son un orgullo para mí.

Tabla de Contenido

Resumen 11

Abstract 13

Introducción 14

Justificación *16*

Pregunta de Investigación *17*

Objetivo General *18*

Objetivos Específicos *18*

Marco Teórico 19

Proteínas del Plasma Seminal *19*

Binder Sperm Proteins (BSPs) *20*

Espermadhesinas *21*

Osteopontina *24*

Proteínas del Plasma Seminal y su Relación con la Criopreservación *28*

Producción de Proteínas Recombinantes de Interés en Criopreservación de Semen Bovino *31*

Materiales y Métodos 33

Genes, Plásmidos y Bacterias *34*

Preparación de Células Competentes de *E. col*i *36*

Transformación Celular *37*

Comprobación de Colonias Positivas *38*

Pruebas de Expresión *39*

Disrupción de las Células Bacterianas *40*

Electroforesis SDS PAGE y Western Blot *41*

Producción y Purificación de las Proteínas Recombinantes *42*

Concentración y Diálisis de las Proteínas Recombinantes..... *43*

Cuantificación de Proteína por el Método de Bradford *44*

Bioensayo con aSFP-H6 en Semen Descongelado *45*

Análisis Estadístico *46*

Resultados 47

Transformación Celular..... *47*

Crecimiento de Células Transformadas *49*

Determinación de las Condiciones Óptimas de Producción y Purificación para aSFP-H6 BL21STAR..... *57*

Adición de raSFP-H6 a Semen Descongelado..... *62*

Discusión..... 65

Conclusiones 70

Recomendaciones ……. 68

Referencias ……... 69

Anexos..... 90

Lista de Figuras

Figura 1. Cuadro De Proteínas Del Plasma Seminal Presentes En El Semen (Brijaldo,2022).....20
Figura 2. Modelo Cristalográfico Del Dímero Asfp Y Sus Enlaces De Hidrogeno Entre Las Cadenas B8 Y B7, Interacciones Hidrofilias E Hidrofóbicas, ...23
Figura 3. Modelos De Unión De Las Proteínas Del Plasma Seminal Osteopontina (Opn) En Espermatozoides Eyaculados Y Ovocitos.....25
Figura 4. Modelo Sugerido Por Moura (2005) Para Explicar La Interacción De La Opn Con El Espermatozoide Eyaculado Y El Ovocito.....26
Figura 5. Características Estructurales De La Osteopontina.....27
Figura 6. Esquema Básico De La Producción De Las Proteínas Recombinante En *E.Coli* 33
Figura 7. Constructo Plasmídico Pet28(A+) Conteniendo El Promotor Inducible por Iptg (Lacl), ...35
Figura 8 Constructo Plasmídico Pet28(A+) Conteniendo El Promotor Inducible por Iptg (Lacl).....35
Figura 9. Constructo Plasmídico Pdass Conteniendo El Promotor Inducible Por Iptg (Lacl),.....36
Figura 10. Digestión Enzimática Con Bamhi Y Hindiii De Los Plásmidos Extraídos A Partir De Cultivos De Colonias Seleccionadas En Placas De Agar Con Ampicilina. 47
Figura 11. Digestión Enzimática Con Xhoi Y Mlui De Los Plásmidos Extraídos A Partir De Cultivos De Colonias Seleccionadas En Placas De Agar Con Kanamicina 48
Figura 12. Digestión Enzimática Con Xhoi Y Mlui De Los Plásmidos Extraídos A Partir De Cultivos De Colonias Seleccionadas En Placas De Agar Con Kanamicina. 49
Figura 13. Cinética De Crecimiento De La Cepa De *E. Coli* Bl21star Transformada Con El Plásmido Pet28(A+)-Rasfp-H6. 50
Figura 14. Cinética De Crecimiento De La Cepa De E. Coli Bl21star Transformada Con El Plásmido Pet28(A+)-Ropn-H6.....50
Figura 15. Cinética De Crecimiento De La Cepa De E. Coli Bl21 (De3) ™ Transformada Con El Plásmido Pdas-Rasfp.....51
Figura 16. Comparación Bacteriana En Diferentes Condiciones Se Realiza Prueba De Normalidad De Shapiro, La Prueba No Paramétrica De Kruskal-Wallis Y Una Prueba Post-Hoc De Dunn. 52

Figura 17. Diferencias De Crecimiento De Bl21star Transformada Con Pet28(A+)-Ropn-H6 Luego De Inducir La Producción Con Iptg A Dos Concentraciones (0.1 Y 1.0 Mm)…… 53
Figura 18. Electroforesis En Geles De Poliacrilamida (Sds-Page) Y Western Blot De Las Fracciones Solubles (L1,L3, L5 Y L7) E Insolubles (L2 , L4 ,L6 Y L8) Extraídas De Cultivos De Bl21 (De3) ™, Transformadas Con Pdas-Rasfp De Las Figura A Y B. 54
Figura 19. Purificación por Afinidad al His Tag de Proteína raSFP en la Fracción Soluble del Pellet, Utilizando una Columna HisTrap HP (GE) Unida al Níquel…… 55
Figura 20. Purificación de raSFP-H6 Mediante Columnas de Afinidad a la Histidina…… 56
Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE y Detección por Western Blot de raSFP-H6 de las Fracciones L1 a L9 Extraídos de Cultivos BL21STAR, Transformadas con pET28(a+) raSFP-H6……. 56
Figura 22. Electroforesis SDS-PAGE y Detección por Western Blot de raSFP-H6 de las Fracciones 1 a L9 Extraídos de Cultivos BL21STAR, Transformadas con pET28(a+) raSFP-H6……... 57
Figura 23. Purificación por Afinidad al His Tag de Proteína raSFP-H6 en la Fracción Soluble del Pellet, Utilizando una Columna HisTrap HP (GE) Unida al Níquel……58
Figura 24. Purificación de raSFP-H6 Mediante Columnas de Afinidad a la Histidina…… 59
Figura 25. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las Fracciones Solubles (L1 y L3) e Insolubles (L2 y L4) Extraídas de Cultivos de BL21STAR, Transformadas con pET28(a+)-rOPN-H6…… 59
Figura 26. Purificación de rOPN-H6 Mediante Columnas de Afinidad a la Histidina. …… 61
Figura 27. Variables de Motilidad Espermática de Pajillas Descongeladas e Incubadas Durante Una Hora a 37 °C con Diferentes Concentraciones de raSFP…… 61
Figura 28. Viabilidad Espermática Medida como Porcentaje de Espermatozoides con Membrana Espermática Integra, en Pajillas Incubadas Una Hora a 37 °C con Diferentes Concentraciones de raSFP …… 63
Figura 29. Viabilidad espermática medida como porcentaje de espermatozoides con membrana espermática integra, en pajillas incubadas una hora a 37 °C con diferentes concentraciones de raSFP ……64

Lista de Tablas

Tabla 1. Condiciones de Cultivo para las Pruebas de Expresión de las Proteínas Recombinantes Producidas en *E. coli*…… 40

Tabla 2. Tampones Empleados para la Purificación de la Proteína raSFP-H6 pET 28(a+) a través de una columna HisTrapHP (GE)……. 43

Lista de Anexos

Anexo 1. Constancia de Aprobación de la Tesis…… 90

Anexo 2. Secuencia de cDNA de la aSFP Bovina se Identifica el Codón de Iniciación de la Traducción (Nucleótido 488 a 490) y el Codón de Terminación de la Traducción (Nucleótidos 890 a 892)……91

Anexo 3. Secuencias de cDNA de OPN Bovina. En Negro se Encuentra Señalado el Codón de Inicio de Traducción (Nucleótido 64 y 66) y el Codón de Terminación de la Traducción (nucleótidos 898 y 900) (Kerr et al., 1991)…….,,92

Anexo 4. Secuencia de ADNc aSFP Bovina (NM_174616.3) Precursor Spermadhesin-1 (134 aa), Tomado del Repositorio de NCBI……94

Resumen

Desde hace algunas décadas, la ganadería colombiana ha empezado a involucrar técnicas biotecnológicas para la optimización de procesos reproductivos con el fin de mejorar su competitividad y sostenibilidad. En este sentido, el grupo Reproducción Animal del Trópico de AGROSAVIA ha dedicado parte de sus esfuerzos hacia el desarrollo de suplementos a base de proteínas del plasma seminal bovino, que ayuden a mitigar el impacto que tiene la criopreservación sobre la integridad y funcionamiento de los espermatozoides. De acuerdo con lo anterior, esta propuesta plantea la producción recombinante, a través de sistemas procariotas, para dos proteínas: Espermadhesinas 1, también conocida como aSFP y Osteopontina (OPN). Estas proteínas han sido reconocidas por su papel protector en el espermatozoide bovino y su relación con la interacción espermatozoide- ovocito. Para esto, las secuencias genéticas de cada proteína fueron insertadas en plásmidos de *Escherichia coli* inducibles por IPTG, que contenían marcadores de selección por antibióticos y una cola de seis histidinas (H6). Se evaluó la expresión de las proteínas bajo diferentes condiciones (concentraciones de IPTG y temperatura), y se encontró que la mejor expresión de aSFP-H6 se evidenció a 37 °C y 0.01 mM de IPTG, mientras las mejores condiciones de expresión para OPN-H6 fueron 37 °C con IPTG de 0.1 mM. La aSFP-H6 obtenida, fue purificada a través de columnas de afinidad a la histidina y se realizó un bioensayo para evaluar la calidad seminal post-descongelación después de la adición de aSFP-H6 en diferentes concentraciones (7.5 µg, 15 µg y 30 µg x 10^6 espermatozoides). Estos análisis mostraron que la adición de aSFP-H6 disminuye notoriamente la motilidad espermática, efecto que se incrementa al aumentar la cantidad de aSFP-H6. Esto podría aprovecharse para disminuir el gasto energético prematuro del espermatozoide en procesos de inseminación artificial o fertilización *in vitro*. De esta manera, se espera que los resultados de este trabajo contribuyan con el desarrollo y

optimización de medios definidos basados en proteínas y que puedan mitigar el efecto deletéreo causado por la congelación en las células espermáticas.

Palabras Claves**:** Criopreservación de semen, Proteínas del plasma seminal, Calidad espermática, Proteína ácida del fluido seminal, Osteopontina, Proteínas recombinantes.

Abstract

Some decades ago, the Colombian cattle industry started to include different biotechnological tools to optimize reproductive processes and enhance its sustainability and competitiveness. In this sense, the research group on tropical reproduction animal from AGROSAVIA focused efforts on the development of protein-based supplements from the bovine seminal plasma to mitigate the deleterious impact of cryopreservation procedures on sperm integrity and function. In this regard, the purpose of this work was the recombinant production of two seminal plasma proteins: Spermadhesin-1, also known as aSFP, and Osteopontin (OPN). Both proteins have been recognized to participate in the sperm protection natural mechanisms and the sperm-oocyte interaction process. For this, the genetic sequences of each protein were inserted in Escherichia coli plasmids, IPTG inducible and containing both: antibiotics selection markers as well as a six-histidine tag (6x his). The expression of the recombinant proteins was evaluated under different temperatures and inducer concentrations. Results showed the best conditions for aSFP-H6 were 37 °C, and 0.01 mM IPTG and for OPN-H6 was 37 °C with IPTG 0.1 mM. Produced aSFP-H6 was purified through histidine affinity columns, and a bioassay was performed to evaluate the effect of adding different quantities of aSFP-H6 (7.5 µg, 15 µg, and 30 µg x 10^6 sperm cells) on the post-thaw seminal quality. These results showed that sperm motility decreases by adding recombinant aSFP, and this effect is more notorious at higher amounts of aSFP-H6. This result could be an advantage in reducing the early energy expenditure of sperm cells in artificial insemination or in vitro fertilization procedures. In this way, these results could be relevant for the formulation of a defined medium to mitigate the sperm quality decrease caused by cryopreservation on sperm cells.

Keywords: Semen cryopreservation, seminal plasma proteins, sperm quality, Acidic seminal fluid proteins, Osteopontin, recombinant proteins.

Introducción

En Colombia, las políticas actuales sobre explotación ganadera han venido evolucionando debido a su creciente papel en la economía. Esta evolución requiere la implementación de estrategias eficientes para mantener el crecimiento de la ganadería bovina de forma que se asegure su competitividad y sostenibilidad. Teniendo en cuenta lo anterior, una alternativa interesante es la optimización y desarrollo de herramientas biotecnológicas que contribuyan con la eficiencia reproductiva. El uso de estas herramientas contribuye con la diseminación y protección de los recursos genéticos a través de técnicas como la criopreservación de semen. En este sentido, la criopreservación ayuda a la mejora del material genético sirviendo de forma eficiente en la inseminación y disminuyendo los costos de los procesos reproductivos (Ribeiro-Peres et al., 2014), reduciendo además la diseminación de enfermedades a través del semen en el hato (Souza Castelo et al., 2008).

Sin embargo, aunque las técnicas de congelación han venido evolucionando, siguen existiendo retos importantes respecto a la calidad espermática post-descongelación. Los esfuerzos han sido enfocados en disminuir los efectos deletéreos provocados por la congelación de las células espermáticas y se ha optado por el uso de diferentes estrategias que van desde la selección de toros con altos índices de "congelabilidad" (Rueda et al., 2013), hasta el uso de proteínas del plasma que mejoran la integridad espermática (Cardozo et al., 2009).Dado lo anterior, las investigaciones realizadas por el grupo de reproducción animal tropical en la Corporación colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA, se han enfocado en el análisis del plasma seminal proveniente de la raza criollas la cual cuenta con buenas características adaptativas que se demuestran en las altas tasas reproductivas (Velásquez, 2013).

Adicionalmente, los estudios proteómicos han demostrado que la adición de proteínas provenientes del plasma seminal con bajo peso molecular contribuye con la disminución de los efectos deletéreos durante la criopreservación de células espermáticas (Rueda et al., 2013).En el caso de los bovinos, los estudios sobre la estructura y actividad biológica de las proteínas del plasma seminal (PPS) han destacado su estrecha relación con la actividad mitocondrial, la motilidad espermática, la regulación de la capacitación y la protección del espermatozoide contra el estrés térmico y oxidativo (Barrios et al., 2000; Aitken & Baker, 2006).

Aunque en AGROSAVIA se han hecho importantes acercamientos sobre el uso de proteínas del plasma seminal para el desarrollo de medios de criopreservación, la purificación de estas proteínas en su forma nativa es un proceso complejo con porcentajes de recuperación bastante bajos que requieren la recolección de cantidades importantes de material biológico. Al respecto, la biotecnología de proteínas recombinantes se presenta como una interesante alternativa que puede contribuir al aumento de la eficiencia de técnicas como la criopreservación de semen, la inseminación artificial y la producción de embriones *in vitro*.

En este sentido, este trabajo propone la expresión recombinante, mediante una fábrica celular bacteriana, de dos proteínas que han evidenciado tener una importante relación con la calidad del semen y a fertilidad del macho bovino: la Espermadhesinas 1, también conocida como aSFP y la Osteopontina (OPN). Ambas proteínas han sido descritas en cuanto estructura y función y participan tanto en los mecanismos biológicos de protección contra el estrés térmico y oxidativo, como en la interacción y reconocimiento de gametos previa a la fecundación. En el caso de la aSFP, su importancia radica en que participa en la regulación de la actividad mitocondrial y la motilidad espermática (Roncoletta et al., 2006).

Adicionalmente se ha descrito que tiene un importante potencial antioxidante que se atribuye a una característica estructural en la cual uno de los puentes disulfuro que forma, está

activo durante la función de las reacciones redox. Por su parte, se ha descrito que la OPN participa en el proceso de fecundación (Boccia et al., 2013) y además ha sido reconocida como un marcador de fertilidad del macho bovino (Wei et al., 2017; Willforss et al., 2021). Adicionalmente, la OPN mejora la producción embriones en condiciones *in vitro* y favorece la capacitación espermática, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Gabler et al., 2003; Monaco et al., 2009; A. Moura, 2005) . Por todo lo anterior se espera que la producción recombinante de estas proteínas, contribuyan con el desarrollo de medios que puedan disminuir el impacto de los procesos de criopreservación sobre las células espermáticas en bovinos.

Justificación

La ganadería bovina hace parte de uno de los sectores más importantes de la economía colombiana, sector en el cual la reproducción hace parte fundamental del éxito productivo. En este sentido, las técnicas de biotecnología reproductiva han generado grandes avances para aumentar los índices productivos, pero aún presentan posibilidades de mejora. Una de las técnicas más usadas en la ganadería colombiana es la criopreservación del semen, la cual busca disminuir los costos de producción aumentando las tasas de natalidad, por medio de procedimientos de inseminación artificial y conservación de material genético sin fecha de caducidad y facilidad de diseminación. Lo anterior requiere un número mínimo de espermatozoides con membranas integras con una gran motilidad y calidad del ADN. A pesar de la amplia difusión de la criopreservación espermática, dicho proceso genera efectos adversos sobre la integridad y la capacidad funcional del espermatozoide, lo que resulta en disminución de su fertilidad cuando se compara con la fertilidad del espermatozoide en fresco. (Watson, 2000).

Por su parte, se ha descrito que el proceso de fecundación están regulado en gran medida por las proteínas presentes en el plasma seminal (Manjunath, 2016; A. Moura, 2005; Rego et al., 2015; Rodrigues et al., 2013), cuyas funciones y actividades biológicas incluyen la protección contra el choque térmico y los procesos de oxidación (Aitken et al., 2012; Pini et al., 2018; Watson, 1995). El contenido proteico del plasma seminal tiene una estrecha relación con los patrones de fertilidad normales y además con la congelabilidad de los espermatozoides, entendida como la capacidad de las células para mantener su integridad y funcionalidad después del estrés que supone un proceso de congelación (Roncoletta et al., 1999).

El uso de estas proteínas del plasma seminal para contrarrestar los efectos de la criopreservación en semen de ganado criollo e introducido ha arrojado resultados positivos cuando se adicionan proteínas de plasma seminal de bajo peso molecular (<16 kDa) obtenidas por cromatografía de exclusión por tamaño, empleando las fracciones IV y V en dosis específicas (Polo, 2018a).

Teniendo en cuenta que en los resultados de trabajos anteriores se han identificado estas proteínas en su estructura y función dentro del plasma seminal bovino, la producción recombinante mediante fabricas celulares bacterianas y su adición a medios de criopreservación podría convertirse en una alternativa para el desarrollo y optimización de medios que puedan, a su vez, mejorar los procesos de fertilización *in vivo e in vitro*, mitigando el efecto deletéreo causado por la congelación de las células espermáticas.

Pregunta de Investigación

¿Es posible producir proteínas del plasma seminal de forma soluble en fábricas celulares bacterianas?

Objetivo General

Producir y purificar las proteínas Osteopontina y Espermadhesina-1 de forma recombinante en una fábrica celular bacteriana.

Objetivos Específicos

Establecer las condiciones óptimas para producir OPN-H6 y aSFP-H6 de forma recombinante usando Escherichia coli.

Determinar las condiciones adecuadas para purificar proteínas rOPN-H6 y raSFP-H6 previamente producidas en la *Escherichia coli.*

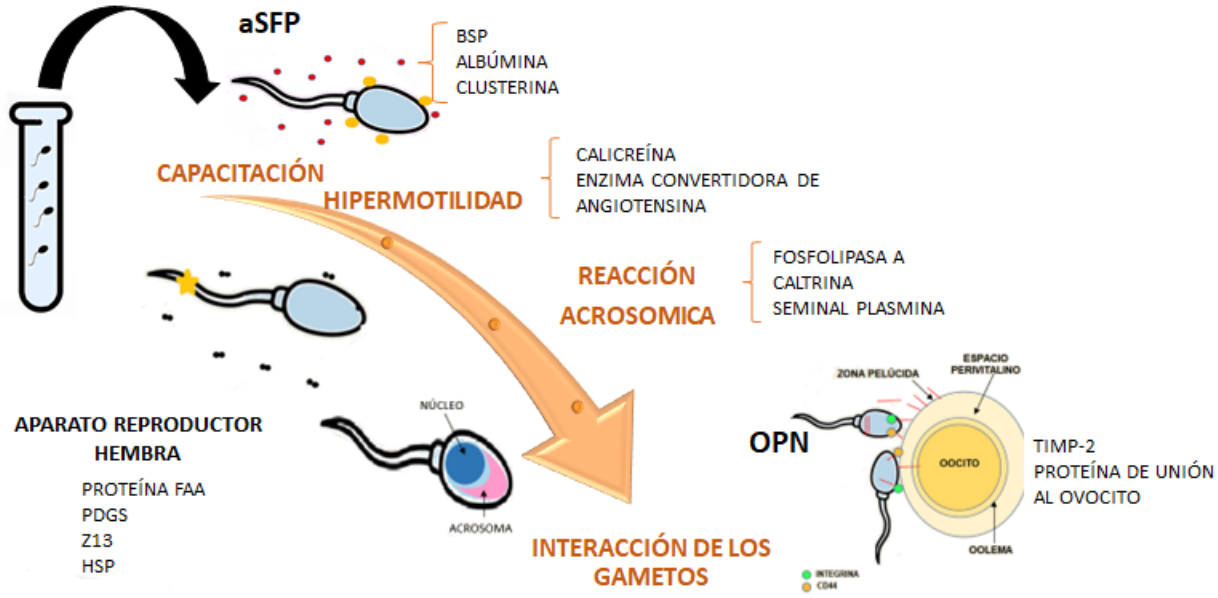
Evaluar las características funcionales de la raSFP-H6 en la calidad seminal post-descongelación de semen de toros

Marco Teórico

Proteínas del Plasma Seminal

El semen es una mezcla de secreciones dentro de la cual se encuentran las células espermáticas y el plasma seminal. Este último no solo es el vehículo de los espermatozoides sino además les provee las sustancias necesarias para que logre atravesar el tracto de la hembra y lograr una fecundación exitosa. Dado que, durante la maduración de las células espermáticas, estas pierden los organelos necesarios para la síntesis de proteínas, los espermatozoides maduros que son eyaculados deben incorporar las proteínas del plasma seminal para llevar a cabo procesos como la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la interacción con el ovocito (Rueda et al., 2012) . Adicionalmente, se ha descrito que dentro de las funciones de las proteínas del plasma seminal se encuentra la protección contra estrés térmico y oxidativo, proteínas de especial en procesos que involucran la protección espermática durante su tránsito, almacenamiento en el epidídimo, eyaculado y el transito inicial del útero (Quintero, 2018). A pesar de que muchas de ellas se han relacionado con la fertilidad del macho bovino, actualmente no hay un consenso sobre cual se relaciona más con este parámetro y algunos trabajos señalan que puede ser una sinergia entre varias proteínas la que describa mejor el potencial fertilizante de los espermatozoides en el macho bovino (Schoneck et al., 1996). En la figura 1 se observan los grupos de proteínas más importantes encontrados en el plasma seminal bovino.

Figura 1. Cuadro de Proteínas del Plasma seminal presentes en el semen (Brijaldo,2022).



Fuente: Brijaldo, 2022.

Binder Sperm Proteins (BSPs)

Las proteínas BSP “proteína seminal de unión” (por sus siglas en inglés) son las más abundantes del plasma seminal bovino y pertenecen a la familia de proteínas de unión de heparina (Moura et al., 2007). Poseen dos dominios de fibronectina tipo II presentándose en cadenas simples, dentro de las BSP se incluyen las BSP1 (BSP-A1/-A2 o PDC-109) y BSP3 (BSP-A3) que poseen masas moleculares entre 15-16.5 kDa. Mientras que BSP5 (BSP-30kDa) tiene una masa molecular de 28-30 kDa (Leblond et al., 1993; Manjunath et al., 2009). De esta manera, todas presentan diferentes grados de glicosilación que intervienen con el aumento de la actividad chaperona, excepto en la BSP3 que no son glicosiladas (Esch et al., 1983; B. P. Singh et al., 2020). Antes se clasificaban en BSP-A1 y BSP-A2 después cambio su nombre a PDC-109 debido a los 109

aminoácidos de la cadena (Nauc & Manjunath, 2000). Estas proteínas son secretadas por las vesículas seminales y se adsorben en la superficie durante la eyaculación (Thérien et al., 1997) y las BSP se ubican principalmente en la pieza intermedia, cabeza, acrosoma y post acrosoma del espermatozoide (Manjunath et al., 1994; Manjunath, et al, 1993) evitando el movimiento de los fosfolípidos y generando una estabilización de la membrana.

El mecanismo de acción de las BSP secretadas por las vesículas seminales se unen a la membrada del espermatozoide que interactúan con las HDL que provocan la salida de colesterol reorganizando la membrana y estabilizando la unión a los fosfolípidos de la membrana (Puttaswamy & Fan , 2006) . A demás, la salida del colesterol activa los canales de Ca++ y por consiguiente su ingreso y posterior activación de la proteína kinasa lo que fosforila la tirosina y activa la capacitación y motilidad (Naaby-hansen et al., 2002). Algunas otras funciones de las BFP son la estimulación de la unión de los espermatozoides al epitelio oviductal (Kelly et al., 2006); mantener la motilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento en el reservorio oviductal (Gwathmey et al., 2006); regulación de la capacitación (Manjunath & Thérien, 2002) y la protección de la membrana plasmática hasta la fertilización (Barrios et al., 2000).

Espermadhesinas

Son polipéptidos de plasma seminal de 12 a 14 kDa que poseen la propiedad de adherirse a la superficie del esperma durante la eyaculación (Topfer-Petersen et al., 1998). Se identifican dos integrantes de esta familia, la aSFP (Proteína ácida del fluido seminal) y la Z13. Adicionalmente, son importantes glicoproteínas de bajo peso molecular 12-16 kDa compuestas por entre 109 y 133 aminoácidos. Pertenecen al grupo de unión de la heparina (HBPs: heparin binding proteins) que recubre la superficie de los espermatozoides en la eyaculación y procesos de capacitación. Están

involucradas en la interacción espermatozoide-ovocito(Bergeron et al, 2005) y que poseen la propiedad de adherirse a la superficie del esperma durante la eyaculación (Topfer-Petersen et al., 1998).

Considerado un factor anti fecundante que se detecta en las glándulas accesorias (Dostàlovà et al., 1994; Jobim,et al, 2009; Moura et al., 2006b). Por su parte, las aSFP, también llamadas Espermadhesinas-1, se producen en las vesículas seminales, ampollas y epidídimo (Moreau & Manjunath, 2000). Son proteínas no ácidas glicosiladas que tienen de 110 a 130 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 12.9 KDa.

Las aSFP, con 114 aminoácidos, cuentan con 4 residuos de cisteínas adyacentes (Cys10-Cys31 y Cys54-Cys75) y dos puentes disulfuro cuyo azufre puede estar parcialmente oxidado, lo que le otorga la posibilidad de oxidarse o reducirse en presencia de radicales. Adicionalmente, al combinar el isoeléctroenfoque y la identificación de grupos sulfhidrilos se detectaron tres isoformas de aSFP una completamente oxidada, parcialmente oxidada y una completamente reducida lo que también sugiere que la presencia de cisteínas la protección de los espermatozoides del daño oxidativo (Dostälovä et al., 1994).

Dentro de sus características funcionales y estructurales se encuentran: es un factor anti capacitante del espermatozoide y de prevención de la reacción acrosómica prematura (Dostàlovà et al., 1994); actúa en las células granulosas como factor de crecimiento (Dostälovä et al., 1994); altos niveles pueden inhibir la actividad espermática y la actividad mitocondrial (Schoneck, 1996); posee un efecto antioxidante en la peroxidación lipídica sobre la membrana *in vitro* (Schoneck, 1996); cuenta con dos residuos de cisteína Cys^{54} y Cys^{75} de diferente reactividad que puede proteger a los espermatozoides del daño oxidativo, lo que podría explicarse por su comportamiento de reducción/oxidación ,capturando las especies reactivas de oxígeno (Bustamanete Filho, 2010; Romão et al., 1997); estimula la división celular y la secreción de progesterona de las células de la

granulosa bovina *in vitro* de manera potente y dependiente de la dosis (Einspanier et al., 1994); se relaciona con la fertilidad del macho bovino, la protección contra el estrés oxidativo e incluso la restauración de la membrana del espermatozoide sometida a la crioconservación (Cardozo, 2008) en la (figura 2) se observa la estructura empleando el modelo cristalográfico. Lo anterior protege al espermatozoide contra el daño ocasionado por estrés oxidativo. En toros de la raza San martinero, parece tener un efecto reparador de la membrana espermática otorgando mayor viabilidad post descongelación con respecto al semen de Cebú (Rueda , 2011).

Se ha encontrado que la aSFP presenta una función reguladora de la actividad mitocondrial y reduce el metabolismo (Magalhães et al., 2016).

Figura 2. Modelo Cristalográfico del dímero aSFP y sus enlaces de hidrogeno entre las cadenas b8 y b7, interacciones hidrofilias e hidrofóbicas,

Fuente: *(Romão et al., 1997)* .

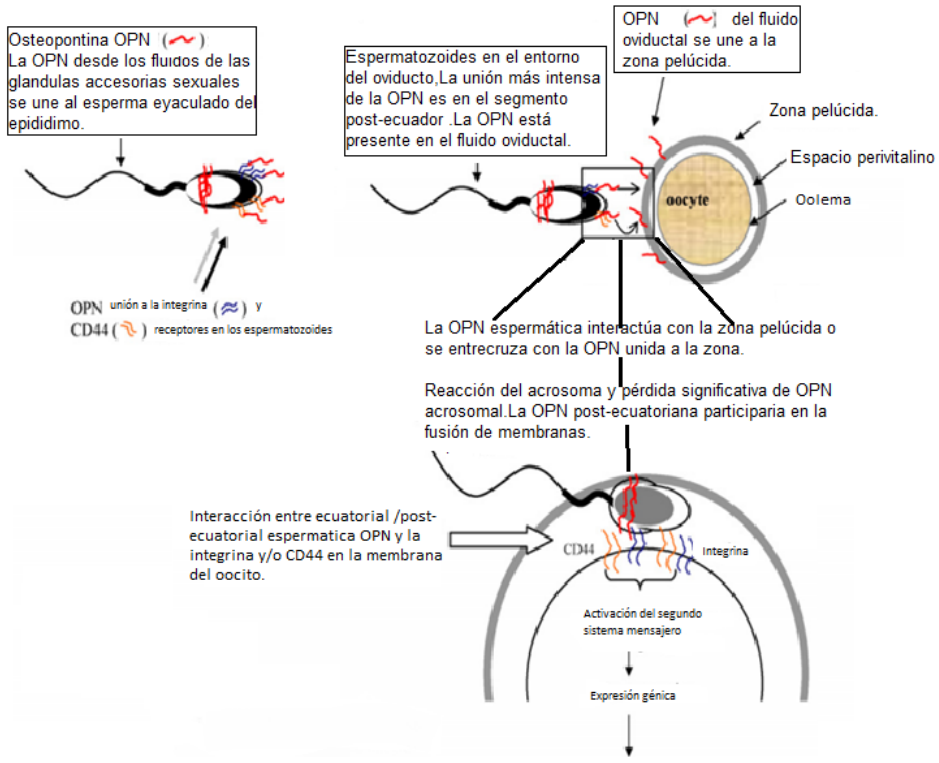
Osteopontina

Es una glicoproteína acida multifuncional del plasma seminal, adquirida en la eyaculación (Souza et al, 2008) y en el fluido oviductal empleando las integrinas para la interacción (Gabler et al., 2003) . La naturaleza acida de la Osteopontina (OPN) se atribuyó a la gran cantidad de ácido aspártico y ácido glutámico (Franzen & Heinegard, 1985). Está constituida por 278 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 25 a 80 kDa y pertenece a la familia SIBLINGS (small integrin –binding Ligan, N liked glycoprotein) (Denhardt, 2001; A. Moura, 2005). Se localiza en la ampolla y vesículas seminales (Cancel, A.M., D.A. Chapman, 1999) y en la cabeza y cola del espermatozoide. La OPN es una glicoproteína ácida multifuncional del plasma seminal que se adquiere en la eyaculación (Souza et al., 2008). Se aisló originalmente de la matriz ósea bovina y está asociada a la fertilidad en las fases preimplantación e implantación durante el desarrollo embrionario.

A continuación, algunas de las características funcionales de la OPN son: Se ha relacionado con toros de alta fertilidad (Moura, 2006); protege de la superficie las glándulas accesorias sexuales evitando las infecciones bacterianas (Brown et al., 1992); mejora la producción *in vitro* de embriones y tiene una importante influencia en la capacitación espermática así como está involucrada en la unión espermatozoide-ovocito, y el desarrollo embrionario temprano (Gabler & Killian, 2003; Monaco et al., 2009; A. Moura, 2005). Así mismo, se ha determinado que la OPN y la heparina favorecen la fertilización *in vitro* al mejorar la capacitación del espermatozoide y el rendimiento de blastocistos en búfalos (Boccia et al., 2013). Se ha descrito que la OPN interactúa con los espermatozoides empleando los receptores de integrina y/o CD44 que pertenece a la familia del ácido hialurónico, glicoproteína presente en los espermatozoides de los toros, y en el ovocito (Bains et al., 2002; Schoenfelder & Einspanier, 2003). La OPN participa en el proceso de unión espermatozoide ovocito expresándose en el plasma seminal y fluido oviductal actúa formando una

malla .Adicionalmente, Moura sugiere que la OPN se une al esperma en la eyaculación empleando integrinas /CD44 hasta llegar al sitio de fertilización donde la OPN interactúa con la zona pelúcida del ovocito donde se hay también una interacción con la región post-ecuatorial del espermatozoide que ha reaccionado con el acrosoma y donde los receptores CD44 en la membrana del ovocito generarían una señalización intracelular demostrando que la OPN exógena puede tener efectos positivos en el desarrollo embrionario en la fertilización, en el cual la OPN permanece unida a la región post-ecuatorial de los espermatozoides (D'Cruz, 1996; Souza et al., 2008; Kaji & Kudo, 2002; Shur et al., 2004). Adicionalmente, la OPN exógena tiene efectos positivos en el desarrollo embrionario (Souza et al., 2008) (figura 3).

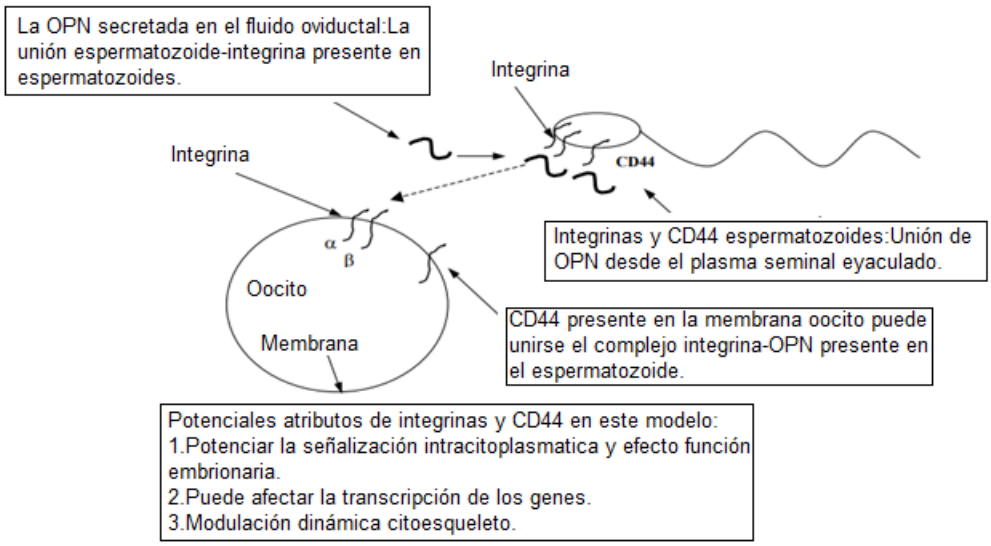
Figura 3. Modelos de unión de las proteínas del plasma seminal Osteopontina (OPN) en espermatozoides eyaculados y ovocitos.



NOTA: Descripción de la interacción de la Osteopontina en el proceso de la fecundación.
Fuente: Adaptado de (Souza et.al., 2008).

El modelo sugerido por Moura (2005) de la figura 4, basado en las características moleculares de la OPN, describe como se une a las integrinas del esperma formando un complejo que se une a las integrinas de los ovocitos. La presencia de OPN en el líquido del oviducto permite la unión a las integrinas espermáticas formando un complejo integrina-OPN o con otras OPN debido a su capacidad de formar enlaces mediados por transglutaminasas (Eckert et al., 2014).

Figura 4. Modelo sugerido por Moura (2005) para explicar la interacción de la OPN con el espermatozoide eyaculado y el ovocito.

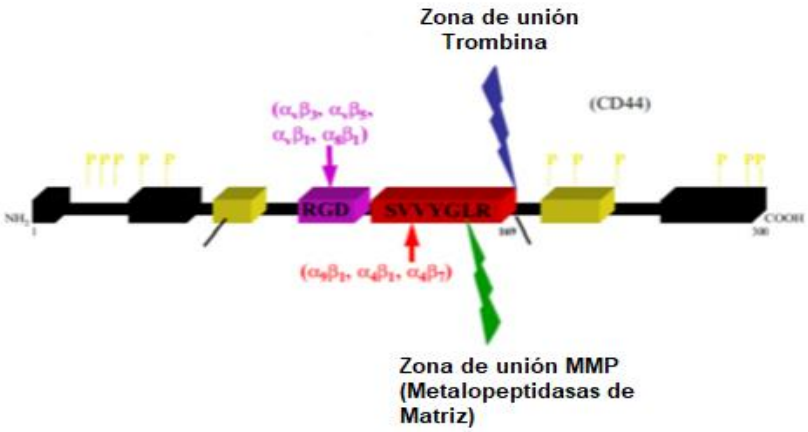


Fuente. Adaptado de Moura, 2005.

Las interacciones entre las integrinas y los péptidos que contienen RGD (según las iniciales de sus tres aminoácidos: arginina, glicina y acido aspártico) son fuertes. La interacción ocurre a través de un surco superficial entre las unidades α y β de integrina y un tándem de residuos RGD (Craig et al., 2004), uniéndose a dos dominios de la hoja β de la OPN (Denhardt et al., 2001) lo cual ayuda a una fijación rápida y adecuada espermatozoide –ovulo como lo muestra la (figura 5).La OPN interacciona con la glicoproteína del CD44 y forman una malla en el gameto masculino y femenino (Bains et al., 2002; Cichy & Puré, 2003; Schoenfelder & Einspanier, 2003).

Adicionalmente, la OPN tiene diferentes interacciones involucradas con la fertilización un ejemplo son los glicosoaminoglicanos (GAG) encargados de inducir la capacitación espermática y la reacción acrosómica. En un estudio con espermatozoides con GAG se observó un aumento de la tasa de fertilización (Bustamante-Filho et al., 2021; Thérien et al., 1999), los espermatozoides están expuestos a importantes cantidades de ácido hialurónico y otros GAG secretados en el tracto femenino. Los GAG participan en la formación de reservorios de espermatozoides porcinos en el oviducto participando en la viabilidad de los espermatozoides (Archibong et al., 1989; Tienthai, 2015).

Figura 5. Características estructurales de la Osteopontina



NOTA: Describe la presencia de los dominios de unión de (Ca2 +), los cuales se muestran en amarillo, y los sitios de fosforilación conocidos (P). También se representan los sitios de escisión conocidos para trombina y MMP. Los otros dominios de unión a la matriz están en negro *Icer & Gezmen-Karadag, 2018*.

Fuente: Adaptado de Icer &Gezmen-Karadag, 2018.

Otro aspecto interesante de la Osteopontina es que podría servir como un biomarcador de pronóstico para el carcinoma colorrectal y tendría un papel importante en la predicción del resultado de la terapia clínica para esta neoplasia, se necesitan estudios más robustos que validen su uso en este sentido (Becerra & Benedetti, 2018).

También se menciona la OPN como un buen indicador de riesgo cerebrovascular en pacientes con placa carotídea, a pesar de que sus niveles y los mecanismos moleculares de expresión no están del todo aclarados (Vicente & Nieves, 2016).

Proteínas del Plasma Seminal y su Relación con la Criopreservación

Los procesos de criopreservación buscan favorecer la inseminación artificial , sin embargo, dentro de las desventajas al utilizar esta herramienta se encuentran las alteraciones morfológicas, fisiológicas y químicas. Estas alteraciones también son causadas por los cambios de temperatura (congelación y descongelación), el estrés osmótico (agentes crioprotectores) y la disminución de la concentración intracelular de cAMP (Chantler & Peskir, 2004; Pons-Rejraji et al., 2009). Todos estas alteraciones generan la reorganización y desestabilización de la membrana y afluencia de calcio (Bailey et al., 2000). La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y función celular a temperaturas bajas y se emplea para preservar germoplasma minimizando el riesgo de transmisión de enfermedades reproductivas por la llegada de bacterias durante la monta, principal motivo de la incidencia de endometritis (Ávila-Portillo et al., 2006; Lindsey et al., 2010a; Martins et al., 2007) .

Sin embargo, cuando el espermatozoide es sometido a temperaturas de 5 °C o menos se genera un fenómeno importante de choque térmico por frío o “cold shock” provoca que las proteínas y lípidos que no están unidos covalentemente cambian de líquido a gel modificando las proteínas de membrana (Parks & Graham, 1992; Watson, 2000). Adicionalmente, si los espermatozoides son enfriados el agua se congelará y los espermatozoides quedarán suspendidos en una solución altamente concentrada, causando su deshidratación. Si el enfriamiento de los espermatozoides es rápido, el agua intracelular no puede salir y se forman cristales de hielo

rompiendo la membrana espermática de forma mecánica y si es lento se deshidrata (Anghel et al., 2013; Pukazhenthi et al., 1999)

Adicionalmente, los espermatozoides durante la criopreservación presentan peroxidación lipídica lo que significa un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species), para contrarrestar este efecto existe un sistema de defensa antioxidante del plasma seminal (Iwasaki & Gagnon, 1992). Por este motivo se han hecho estudios en ovinos empleando el plasma seminal en procesos de fertilización post descongelación confiriendo protección en los espermatozoides (Lozano & Álvarez , 2011). En este sentido, los estudios han encontrado que las Proteínas del plasma seminal tienen una estrecha relación con la "congelabilidad" de los espermatozoides, esta congelabilidad es entendida como la capacidad de las células para mantener su integridad y funcionalidad después de un proceso de criopreservación (Roncoletta et al., 1999).

Por otro lado, en los estudios realizados en cerdos se evidenció la importancia de utilizar células espermáticas y semen con alta congelabilidad, favoreciendo la integridad del acrosoma en los procesos de criopreservación (Henao et al., 2016). Otros estudios relacionados con la adición de proteínas del plasma seminal bovino post descongelación muestran mejora en los parámetros de calidad seminal como la viabilidad y motilidad (Cardozo et al., 2009).

Además, se ha determinado que las proteínas del plasma seminal tienen una relación con la congelabilidad del semen y su calidad seminal post-descongelación. Por ejemplo, resultados obtenido demuestran que las proteínas de bajo peso molecular contenidas en el plasma seminal pueden tener un efecto recuperador de la membrana del espermatozoide bovino sometido a criopreservación (Rueda, et al., 2013). En estudios posteriores, se observa la relación de las proteínas de bajo peso molecular (<16 kDa) de plasma seminal con la calidad del semen utilizando

dosis específicas de fracciones de bajo peso molecular adicionado al semen previo congelamiento lo que permite una mejoría en términos de viabilidad y motilidad post-descongelación (Polo, 2018).

Del mismo modo, se han detectado proteínas relacionadas con alta y baja congelabilidad, entendida como la capacidad del espermatozoide sobrevivir a los procesos de criopreservación. En estos estudios se destacan proteínas como la BSP A1, Clusterina y Albúmina como asociadas a alta congelabilidad, mientras la proteína prostaglandina D sintetasa (PGDS) se detectó en toros con semen de baja congelación (Jobim et al., 2009). En este sentido, se ha reportado que la criopreservación incrementa los sitios de unión entre las proteínas BSPs y la membrana del espermatozoide debido a la perdida de proteínas en la membrana (Ardon & Suarez, 2013). Adicionalmente, los animales reproductores con alta congelabilidad tienen mayor concentración de BSP favoreciendo la preservación de la membrana espermática durante la congelación que producen ROS por la peroxidación lipídica (Jobim et al., 2009; Aitken & Fisher , 1994).

Por último, respecto a la proteína aSFP se ha encontrado una relación importante con la congelabilidad de los espermatozoides bovinos. Lo anterior puede deberse a su potencial antioxidante, el cual tiene un efecto protector frente a la peroxidación lipídica (Jobim et al., 2002).

De otro lado, la alta relación entre la congelabilidad del espermatozoide y la aSFP, puede explicarse por sus efectos sobre frente a la peroxidación oxidativa. En el estudio de Jobim et al. (2003) se observó que estuvo presente en el 90% de los reproductores con mayor congelabilidad y se relacionó con la supervivencia del espermatozoide esto puede ser muy útil para aumentar la fertilidad y las poblaciones de ganado (Pardede et al., 2020).

Por otra parte , el uso de suplementos en el medio de fertilización como por ejemplo factor inhibidor de la leucemia (LIF) y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) *in vitro* ha

evidenciado un incremento en el desarrollo de blastocistos, y parece mejorar la tolerancia del embrión al proceso de congelación (Stoecklein et al,. 2021). En este sentido, la expresión de OPN en sistemas recombinantes puede ser una alternativa para el desarrollo de aditivos biológicos capaces de aumentar la eficiencia reproductiva del semen criopreservado, para ser usado en procesos como la inseminación artificial y la producción de embriones in vitro de alto valor genético.

Además, se deben conocer las estructuras y las funciones de las proteínas en los procesos de reproducción para ser aplicados en la criopreservacion y determinar que proteínas pueden ser biomarcadores para la selección de machos fértiles.

Producción de Proteínas Recombinantes de Interés en Criopreservación de Semen Bovino

Alrededor de las proteínas del plasma seminal bovino se han desarrollado numerosos estudios, se ha descrito que las proteínas relacionadas con la alta fertilidad pueden aislarse y purificarse para usarse en diluyentes que mejoren la calidad espermática después de la descongelación (Druart et al., 2019).

Otros estudios se han enfocado en la producción de proteínas recombinantes del plasma seminal para conocer más a fondo su estructura, función y aumentar la eficiencia reproductiva del semen congelado (Alvarez-gallardo et al., 2013). Algunas proteínas como la Espermadhesina-1, se lograron producir en un pET 23(a+) en cepas electrocompetentes BL21 pLysS de forma insoluble, después se utilizó ADNc de aSFP obteniéndose de forma insoluble y purificándose con urea (Bustamanete Filho, 2010; I. Bustamante-Filho et al., 2014). Por su parte, la Binder Sperm Protein (BSP) BSP-A2 se obtuvo con cuerpos de inclusión (Singh et al., 2020) que puede limitar su aplicación práctica. Finalmente, la expresión de rOPN se realizó por primera vez en un pET 23(a+) con cepas BL21 pLysS resultando con una baja expresión, imposibilitando su purificación

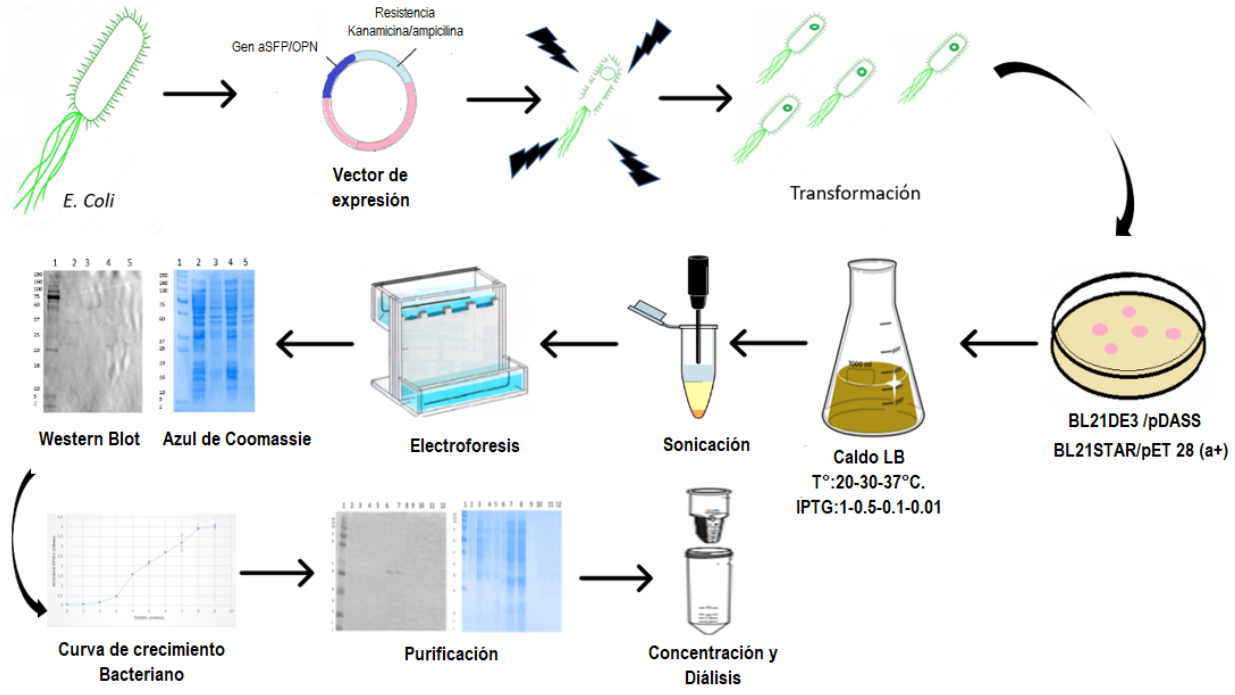
(Bustamanete Filho, 2010). La rOPN se expresó con cDNA de una glándula vesicular bovina obteniéndose de forma insoluble y purificada con urea, pero al realizar los bioensayos con espermatozoides no fueron concluyentes (Bustamante-Filho et al., 2021).

Es muy importante recordar que las funciones biológicas de las proteínas dependen en parte de las modificaciones post-traduccionales más complejas como la glicosilación o fosforilación, en este caso la bacteria *E. coli* no cuenta con toda las herramientas para realizar estos procesos (Lara, 2011). Sería interesante para tener unas mejores modificaciones post-traduccionales utilizar sistemas heterólogos como células de insectos o mamíferos.

Materiales y Métodos

Este trabajo se desarrolló en las instalaciones de la Corporación colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá localizado en el Km 14 vía Mosquera. El trabajo experimental se realizó en los laboratorios de Genética Molecular, Microbiología Pecuaria y Reproducción Animal. Las actividades mostradas en esta tesis hicieron parte del proyecto "*Soluciones biotecnológicas para mejorar el desempeño reproductivo de los bovinos en procesos in vivo e in vitro"* como parte de la agenda interna de investigación de AGROSAVIA y financiado por el ministerio de agricultura y desarrollo rural MADR. El esquema general de los experimentos se describe en la figura 6.

Figura 6. Esquema básico de la producción de las proteínas recombinante en *E.coli*

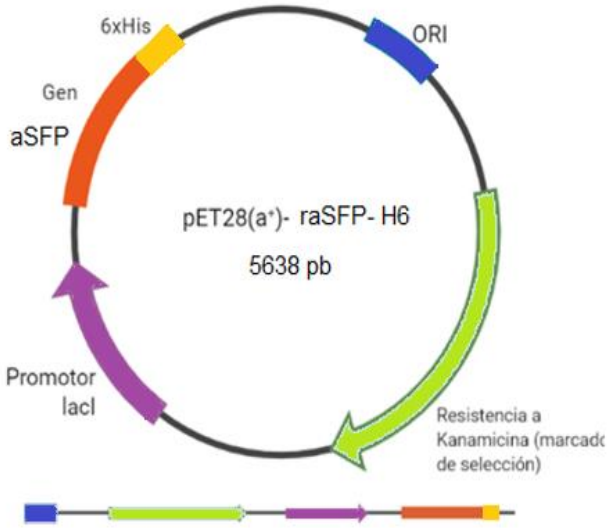


Fuente: Brijaldo, 2022

Genes, Plásmidos y Bacterias

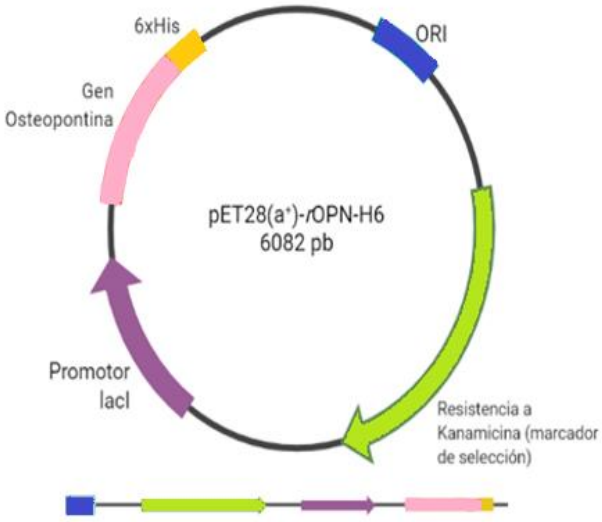
Para la obtención de las proteínas recombinantes, se realizó la solicitud de síntesis de los genes de la aSFP y OPN cómo servicio a la empresa BIOMATIK (Wilmington, DE, EE.UU.). La orden de síntesis se realizó con base en las secuencias reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information ; http://www.ncb.nlm.nih.gov/). Para la aSFP se empleó la siguiente secuencia NM_174616.3 (Anexo 1) y para la Proteína OPN, se usó la secuencia M66236 (Anexo 2). En ambos genes se detectó y se eliminó la secuencia del péptido señal para secreción con el fin de obtener la secuencia aminoacídica de las proteínas en su forma madura (secretada). Cada gen se insertó en un plásmido pET28(a+) inducible por IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido) siendo un isómero imitador de la alolactosa que elimina al represor del operador Lac para que se genere la expresión , con un marcador de resistencia a la kanamicina y una cola de seis histidinas (H6) en la región N-terminal para favorecer la posterior purificación de las proteínas producidas a través de columnas de afinidad a la histidina. Los constructos resultantes fueron pET28(a+)-aSFP-H6 (figura 7) y pET28(a+)-OPN-H6 (figura 8) respectivamente. Adicionalmente, la secuencia de la aSFP también fue insertada en un plásmido pDass que contiene un péptido de traslocación periplasmática, inducible por IPTG y con un cassette de resistencia a la ampicilina. Los constructos fabricados con el plásmido pET28(a+), se usaron para transformar células competentes de la cepa de *E.coli* DH10B con el fin de mantener y estabilizar los plásmidos. Por su parte, el constructo pDass-aSFP-H6 (figura 9) se estabilizo y se mantuvo en la cepa DH5a.

Figura 7. Constructo Plasmídico pET28(a+) Conteniendo el Promotor Inducible por IPTG (lacl),



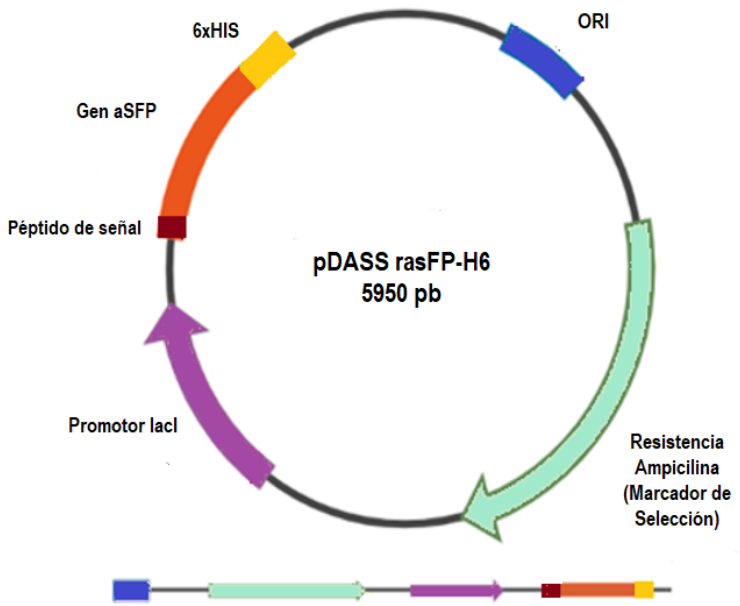
Nota. El Constructo plasmídico pET28(a+) conteniendo el promotor inducible por IPTG (lacl), un cassete de resistencia a la Kanamicina como marcador de selección; y la secuencia de raSFP bovina en su forma madura y una cola de seis histidinas (6xHis) adicionada en la parte N-terminal de la aSFP.
Fuente: Brijaldo, 2022

Figura 8 Constructo plasmídico pET28(a+) conteniendo el promotor inducible por IPTG (lacl)



NOTA. Constructo plasmídico pET28(a^+) conteniendo el promotor inducible por IPTG (lacl), un cassete de resistencia a la Kanamicina como marcador de selección; y la secuencia de rOPN bovina en su forma madura y una cola de seis histidinas (6xHis) adicionada en la parte N-terminal de la OPN .
Fuente: Brijaldo, 2022

Figura 9*. Constructo plasmídico pDass conteniendo el promotor inducible por IPTG (lacl).*



NOTA. Constructo plasmídico pDass conteniendo el promotor inducible por IPTG (lacl), un cassete de resistencia a la Ampicilina como marcador de selección; y la secuencia de raSFP bovina en su forma madura y una cola de seis histidinas (6xHis) adicionada en la parte N-terminal de la aSFP.
Fuente: Brijaldo, 2022

Los constructos estables fueron extraídos de las cepas de mantenimiento y se usaron para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) para el caso de los constructos que contenían la secuencia de la aSFP-H6; y la cepa *E. coli* BL21Star para el caso de la OPN-H6.

Preparación de Células Competentes de *E. coli*

Para la preparación de células electrocompetentes de DH10B se realizó un preinóculo de 15 ml de LB incubado a 37°C y 200 rpm overnigth. Se tomaron 3 mL del preinóculo y se cultivaron en 15 mL de LB hasta lograr un OD entre 0,2 -0,4. El cultivo se incubó en baño de hielo por 20 min y se centrifugó a 3.100 x g, a 4 °C por 20 min. A continuación, se lavó dos veces el pellet con

40 ml agua estéril y se centrifugó nuevamente a 3,100 g por 20 min. Posteriormente se lavó el pellet con 10 ml de agua estéril fría y se realizó nuevamente la centrifugación a las mismas condiciones. Finalmente se lavó con 5 ml glicerol 10% estéril y se resuspendió con 1 ml de glicerol 10% y para ser almacenado a -80°C.

Por su parte, para la preparación de células quimiocompetentes de BL21Star y BL21(DE3) se usó un preinóculo de 10 ml de caldo de LB (Luria Bertani) y 10 µL de la cepa seleccionada en un tubo Falcón 50 ml. El preinóculo se cultivó a 37°C a 200 rpm overnigth y se evaluó la densidad óptica (OD) a 550 nm. Se realizaron los cálculos para obtener un OD de 0.05 final en un volumen de 50 ml de LB usando un Erlenmeyer de 250 ml. El nuevo cultivo se incubó a 37°C y 200 r.p.m. hasta alcanzar una OD de 0.4 a 0.5. Alcanzada la OD, se centrifugo a 4.000 x g durante 15 min a 4 °C.

Posteriormente se agregó 12.5 ml de CaCl2 50 mM y se dejó por 40 min en hielo. Nuevamente se centrifugó a 4.000 x g 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y al pellet se le adicionó 1.25 ml de CaCl2 50 mM. Se dejó por 40 min en hielo y se almacenó en glicerol 15% estéril a -80 °C.

Transformación Celular

La transformación de células DH10B se realizó mediante electroporación. Para esto, las células electrocompetentes se descongelaron y se depositaron en una celda de electroporación con 40 ng del ADN plasmídico construido. La mezcla en la celda se depositó en un electroporador (Bio Rad) a 25µF, 750Ω y 2400V. Inmediatamente después del pulso se agregaron 800 µL de medio LB y la mezcla se incubo a 37°C por 1 hora. Finalmente, las células transformadas se colocaron en una placa de LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante la noche. Del

inóculo inicial se aislaron colonias en otra placa de LB con ampicilina. Las colonias obtenidas se almacenaron en crioperlas a -80 °C.

Por su parte, las células quimiocompetentes de BL21Star y BL21(DE3) se transformaron mediante choque térmico. Para esto, las células se descongelaron y se incubaron con 100 ng del del ADN plasmídico, extraído de las cepas de mantenimiento. La mezcla se incubo durante 1 hora en baño de hielo y posteriormente durante 1 minuto a 42 °C. nuevamente se incubó en baño de hielo durante 30 minutos y se adicionó 0.8 mL de medio LB estéril. EL cultivo se incubó a 37 °C durante 1 hora y se depositó en una placa de petri con LB-Agar y Kanamicina para ser incubadas a 37 °C overnight. Las colonias obtenidas se plaquearon en LB-Agar con kanamicina y se almacenaron en crioperlas a -80 °C.

Comprobación de Colonias Positivas

A partir de las colonias positivas de cada transformación obtenidas en las placas, se seleccionaron varias colonias, se inocularon en 10 ml de caldo LB y se cultivaron durante 16 horas a 37 °C en agitación a 200 rpm. Se recolectó el sedimento celular de los 10 ml de cultivo mediante centrifugación durante 15 minutos a 10000 rpm. Una vez obtenidas las células se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP (QIAGEN) según indicaciones del fabricante. La cuantificación se realizó empleado Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 por triplicado de cada una de las extracciones teniendo en cuenta que los índices óptimos. Se realizó una doble digestión del ADN plasmídico obtenido de acuerdo con cada constructo. Para el caso del pDass-aSFPH6 se emplearon las enzimas de restricción BamHI (5´G GATCC 3´) y HindIII (5´A AGCTT3´) como se observa en la Anexo 3. Para el caso de los constructos pET28(a+)-aSFPH6 y pET28(a+)-OPN-H6 se usaron las enzimas XhoI (Promega Lot:0000404566) y MIuI (Lot: 00003887726). Para las digestiones se usó 1 µg de ADN plasmídico, 0.5 µl de cada una de las

enzimas de restricción y se ajustó el volumen final con H_2O desionizada estéril hasta 20 µl. La mezcla fue incubada a 37ºC durante 2 horas. Posteriormente, la electroforesis en gel de agarosa se realizó adicionando a 2 µl muestras 4 µl de Buffer 6x y de marcador de peso molecular 2 µl para su análisis. Los fragmentos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. Para visualizar el ADN se tiñó con SYBER SAFE, según las indicaciones del fabricante. Para determinar el peso molecular de las bandas de ADN plasmídico se empleó el marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder. Ref SM1333.Lot 000730688.

Pruebas de Expresión

Las pruebas de expresión se realizaron a tres temperaturas (20, 30 y 37 °C) y dos diferentes concentraciones de IPTG como inductor (0.1 y 10 mM), para determinar las mejores condiciones de expresión (Tabla 1). Las pruebas de expresión se realizaron luego de la activación de cada cepa transformada con cada uno de los constructos plasmídicos. Posterior al crecimiento, se midió la absorbancia (OD_{550}) del cultivo y se establecieron nuevos cultivos a partir de cada inoculo con OD_{550} inicial de 0.05. Se prepararon cultivos para evaluar las tres temperaturas y las dos concentraciones de IPTG por duplicado (12 cultivos en total por cada constructo a evaluar). Estos fueron incubados a 37 °C, 200 rpm hasta llegar a una OD_{550} de 0.5. Los cultivos se dividieron para la evaluación del efecto de la temperatura en el crecimiento bacteriano, utilizando los parámetros descritos en la tabla 1. Una vez terminada cada producción, el contenido extracelular fue extraído por disrupción celular mediante ultrasonido y el extracto líquido fue usado para evaluar la producción de las proteínas.

Tabla 1. *Condiciones de Cultivo para las Pruebas de Expresión de las Proteínas Recombinantes Producidas en E. coli*

Cepa/constructo	*Temperatura*	*Concentración de IPTG*	*Tiempo de crecimiento Fase Log*	*Tiempo de producción*
BL21(DE3)/pDASS aSFP	20°C	1 mM	150 min	Overnight
		0,5 mM		Overnight
		0,1 mM		Overnight
		0,01 mM		Overnight
	30°C	1 mM		Overnight
		0,5 mM		Overnight
		0,1 mM		Overnight
		0,01 mM		Overnight
	37°C	1 mM		3 horas
		0,5 mM		3 horas
		0,1 mM		3 horas
		0,01 mM		3 horas
BL21STAR/pET28(a+) aSFP	20°C	1 mM	180 min	Overnight
		0,1 mM		Overnight
	30°C	1 mM		Overnight
		0,1 mM		Overnight
	37°C	1 mM		3 horas
		0,1 mM		3 horas
BL21STAR/pET28(a+) OPN	20°C	1 mM	180 min	Overnight
		0,1 mM		Overnight
	30°C	1 mM		Overnight
		0,1 mM		Overnight
	37°C	1 mM		3 horas
		0,1 mM		3 horas

Fuente: Brijaldo,2022.

Disrupción de las Células Bacterianas

Luego de cada producción se midió la OD_{550} y se separó 1 mL de cada replica para la obtención del pellet mediante centrifugación (4.000 rpm por 15 min). El pellet obtenido fue resuspendido en 1 mL de PBS conteniendo inhibidor de proteasas (Coktail complete EDTA-free, Sigma –Aldrich Lot: 42484600). Para la liberación del contenido intracelular se empleó un sonicador de sonda OMNI SONIC RUPTOR con la sonda ORT-T-156 para un volumen de 1 ml y ORT-T- 0375” para volúmenes superiores a 10 mL. Los pellets de 1 mL se incubaron en baño de

hielo y se aplicaron 3 ciclos de sonicación de 5 minutos por ciclo a 0.5 seg on/off y potencia del 30 %. Para el caso de los pellets resuspendidos en volúmenes de 30 mL en producciones destinadas a la purificación de las proteínas, se aplicaron ciclos de 10 min por ciclos a 0.5 seg on/off y potencia del 40 %. Después de sónicados, los pellets resuspendidos se centrifugaron a 4500 xg por 15 min a 4°C y se obtuvo un producto separado en una fase soluble (sobrenadante) y fase insoluble (pellet) que se almacenó a -80°C.

Electroforesis SDS PAGE y Western Blot

Las fracciones solubles e insolubles se separaron por el procedimiento de electroforesis en una dimensión (1D) en geles de (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). Se utilizaron geles de 7 x 8 cm y 1 mm de grosor con una concentración de acrilamida de 15 % y con la fase concentradora al 4% realizados a partir de una solución stock de poliacrilamida 30% (Anexo 11). La polimerización se realizó adicionando TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) y APS (Persulfato de amonio) al 10 %. Para determinar el peso molecular de las bandas de proteína, se utilizó el marcador de peso Precisión Plus Protein™ Dual Xtra de BioRad (Bio-Rad), con rango de peso entre 2 kDa hasta 250 kDa. Se cargaron 15uL de muestra (3/4 muestra y ¼ tampón de carga Laemmli). Posteriormente las muestras se mezclaron con vortex y se completó la desnaturalización aumentando la temperatura de las muestras hasta 90ºC en baño seco por 5 minutos para la fracción soluble y la insoluble por 40 minutos. La electroforesis se realizó en una cámara Mini Protean II (Bio-Rad), donde se colocaron los geles y fueron cubiertos con el tampón de electroforesis 1X, compuesto por Tris, Glicina y SDS (pH 8,3). La muestra se depositó en los pozos del gel concentrador y la corrida se llevó a cabo con voltaje constante de 140 v, hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. El revelado del gel se hizo mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie R250 al 0,025% por 1 hora y decolorante 12 horas con una solución de ácido acético al

10% y metanol al 30%. El análisis de los geles digitalizados se realizó en el software Image Lab™ (Bio -Rad).

Para el Western blot, los geles de la SDS-PAGE para fueron transferidos a una membrana de PVDF usando solución de bloqueo de membrana con leche y posterior incubación con el anticuerpo primario anti monoclonal HIS (Sigma A7058-1VL) dilución 1:2000 por 1 hora. Se hicieron los respectivos lavados con solución Buffer de lavado y se reveló con 5 ml de PBS 1X y tres gotas de cada uno de los reveladores Vector VIP Peroxidase Substrate (SK-4600). Las imágenes fueron analizadas por el software Image Lab ^{TM} (Bio-Rad).

Producción y Purificación de las Proteínas Recombinantes

Una crioperla de la cada cepa transformada sembrada en 5 ml de Caldo de LB en presencia de 50 µg/ml de Kanamicina y se incubó a 37 °C con agitación constante a 200 rpm overnight. Posteriormente, se realizó un cálculo para lograr un OD_{550} final de 0.05 que se adicionaron a 100 ml del cultivo de Caldo de LB/Kanamicina y se incubaron a 37 °C con agitación constante a 200 rpm evaluando el OD_{550} hasta alcanzar la fase exponencial a la cual se adicionó el inductor (IPTG). Luego de la inducción se realizó la producción a las condiciones establecidas (0.1 mM IPTG y 37 °C, entonces, se adicionó el inductor isopropil β-D-tioglactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 0.1 a 37°C) y el cultivo líquido se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en 30 mL de PBS estéril con inhibidor de proteasas y se realizó la disrupción celular de acuerdo con la metodología descrita en el apartado anterior. Luego de la disrupción se centrifugo el extracto y los sobrenadantes obtenidos de la fase soluble mediante fueron filtrados en membranas de 0.22 µm para ser inyectados en una columna HisTrap HP (GE) de 1 ml conteniendo Niquel inmovilizado. La elución se realizó en un gradiente lineal usando 20 volúmenes de la columna con los tampones conteniendo imidazol en diferentes concentraciones (tabla 2). Se realizó un gel SDS-

PAGE 15% para analizar las fracciones obtenidas en la purificación y un western-blot transfiriendo el gel SDS-PAGE a una membrana de PVDF de acuerdo con la metodología descrita en el apartado anterior. Las imágenes fueron analizadas por el software Image Lab TM (Bio-Rad).

Tabla 2. *Tampones empleados para la purificación de la proteína raSFP-H6 pET 28(a+) a través de una columna HisTrapHP (GE).*

Tampón	pH	Imidazol	NaCl	Tris HCL
Buffer A	8.0	10mM	500mM	20Mm
Buffer B1	8.0	50mM	500mM	20Mm
Buffer B2	8.0	200mM	500mM	20Mm
Buffer B3	8.0	350mM	500mM	20Mm
Buffer B4	8.0	500mM	500mM	20Mm

Fuente: Brijaldo, 2022.

Concentración y Diálisis de las Proteínas Recombinantes

Las fracciones se concentraron y dializaron empleando ultra filtros Millipore AMICON ultra de 3kDa. Para esto, la fracción que contenía la proteína de interés después de pasar por la columna de afinidad se adicionó a los ultrafiltros que se centrifugaron 6.500 rpm a 4 °C. El tiempo varió en función del volumen de la muestra. Después se adicionó el mismo volumen de PBS 1X estéril (NaCl 0.137M, KCl 0.0027, Na_2HPO_4 0.01M, KH_2PO4 0,0018 M) y se centrifugó a 6.500 rpm durante 40 minutos, este paso se repitió dos veces. Para finalizar, la fracción retenida en los filtros se resuspendió con 1 ml de PBS 1X. La fracción resuspendida se sometió al método de Bradford (Bradford, 1976) para determinar la cantidad de proteína obtenida luego de la diálisis y se realizó una SDS-PAGE para analizar el contenido de la fracción.

Cuantificación de Proteína por el Método de Bradford

Para la cuantificación de la proteína recombinante se elaboró hizo una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de BSA. Las soluciones se prepararon con concentraciones entre 50 y 800 µg/ml. Dos µL de curva y/o muestras se depositaron en una microplaca de Elisa junto con 100 µL del reactivo de Bradford (BioRad), para luego realizar la lectura en el espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ mediante el Software Gen5 a una longitud de onda de 595 nm. Partiendo de la Ley de Beer-Lamber, se realizó una curva ordenando en el eje X las concentraciones y en el eje Y las absorbancias, luego se realizó la regresión lineal y se obtuvo la ecuación Y=mx+b y el $R^{2.}$

Semen criopreservado

El semen congelado utilizado para los ensayos biológicos se obtuvo del banco de germoplasma animal de gestionado por AGROSAVIA, en los núcleos de Sanmartinero (CI, La Libertad, Km 14 vía Puerto López). El semen se congeló de acuerdo con los protocolos del laboratorio de reproducción animal. Brevemente: se usó el medio comercial Opticell a una concentración de 70 millones de espermatozoides por mililitro y se empacó en pajillas de 0.5 ml que se marcaron y sellaron por ultrasonido. Las pajillas selladas se llevaron a vapores de nitrógeno líquido durante 10 min hasta alcanzar -120°C. Posteriormente el semen se introdujo en nitrógeno líquido para alcanzar una temperatura de -196°C. Todos los animales del núcleo de la raza Sanmartinero perteneciente al banco de germoplasma, permanecieron bajo pastoreo en praderas con *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria humidicola*, en condiciones óptimas de salud y monitoreo veterinario constante.

Bioensayo con aSFP-H6 en Semen descongelado

Para los ensayos biológicos se usaron 16 pajillas congeladas en las condiciones descritas en el apartado anterior. Para la descongelación, las pajillas se retiraron del nitrógeno líquido y se incubaron, en baño maría a 37°C por 1 min. Se procedió a la evaluación inmediata de la motilidad y la viabilidad espermática y se procederá inmediatamente con la evaluación de los parámetros de calidad seminal. La motilidad espermática se determinó mediante el sistema de análisis espermático computarizado CASA (IVOS) según las especificaciones del proveedor. La viabilidad espermática se determinó por conteo de los espermatozoides con membrana integra en microscopio de fluorescencia NIKON ECLIPSE E600.A 200 µl del semen diluido al que se le adicionaron 5 µl de diacetato carboxyfluoresceina (CFDA) 10mM, y se incubó por 5 min a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 5 µl de ioduro de propidio (IP) 1.5 mM y se incubó nuevamente por 5 min a 37°C. Finalmente las muestras se fijaron con 5 µl de formaldehido 1.7 mM y fueron incubadas por 15 minutos. Las muestras teñidas se evaluaron en tiempo máximo de 30 min contado 200 células por cada muestra y repetición teniendo en cuenta los espermas coloreados con verde como íntegros para calcular el porcentaje en base al total. El semen descongelado se almacenó en tubos eppendorf y se mantuvo a la temperatura de descongelamiento. Se realizaron los cálculos para obtener 4 dosis seminales por tratamiento de 0.5 ml y las pajillas fueron identificadas de acuerdo con el tratamiento asignado de la siguiente forma: T1 (sin proteína), T2 (7.5 µl/10^6 spz), T3 (15 µl/10^6 spz) y T4 (15 µl/10^6 spz). Después de la incubación con *r*aSFP-H6 se permitió 1 hora para el contacto de las proteínas adicionadas. La evaluación de la calidad seminal después de la incubación se realizó según lo descrito anteriormente.

Análisis Estadístico

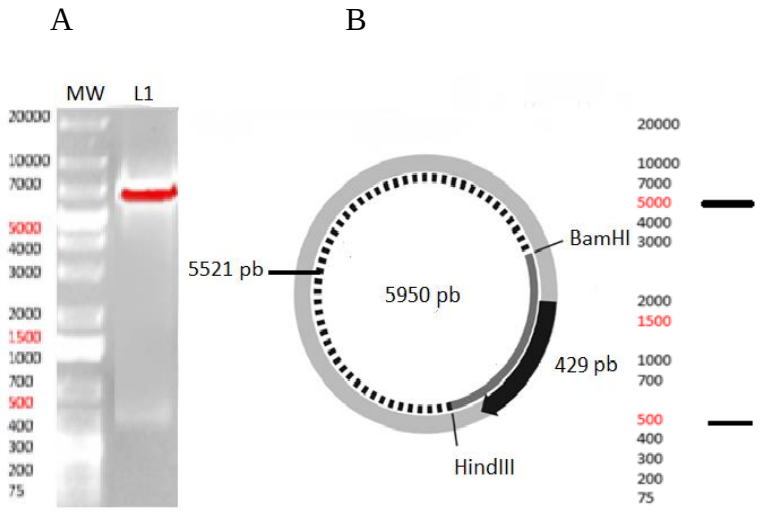
Se buscó determinar las diferencias que se presentaban empleando tres temperaturas (20, 30, y 37°C) y dos concentraciones de IPTG (1.0 y 0.1 mM) en la producción de las dos proteínas recombinantes. Para esto se realizó la prueba de normalidad de Shapiro, un ANOVA y un test Tukey de comparaciones múltiples para las temperaturas. Para determinar la normalidad de los datos en las pruebas de crecimiento de las empleó prueba de normalidad de Shapiro wilk y se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas. Por su parte, se empleó el análisis del crecimiento de las cepas transformadas se realizó a través de la no paramétrico de Kruskal-Wallis y una prueba Post-hoc de Dunn. Por su parte, los ensayos biológicos se analizaron mediante un ANOVA y una prueba de tukey para comparación de medias. Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico SPSS.

Resultados

Transformación celular

Después de realizar la transformación de las cepas de producción BL21(DE3) y BL21 STAR *de Escherichia coli*, se realizaron las comprobaciones del ADN plasmídico en cada uno de los constructos empleados para las transformaciones. Para el constructo pDass-aSFP-H6 se emplearon las enzimas de restricción BamHI y HindIII en el plásmido (figura 10). El tamaño de los fragmentos obtenidos corresponde con lo esperado de acuerdo con el mapa de restricción (5267 y 429 pb).

Figura 10. Digestión enzimática con BamHI y HindIII de los plásmidos extraídos a partir de cultivos de colonias seleccionadas en placas de agar con Ampicilina.

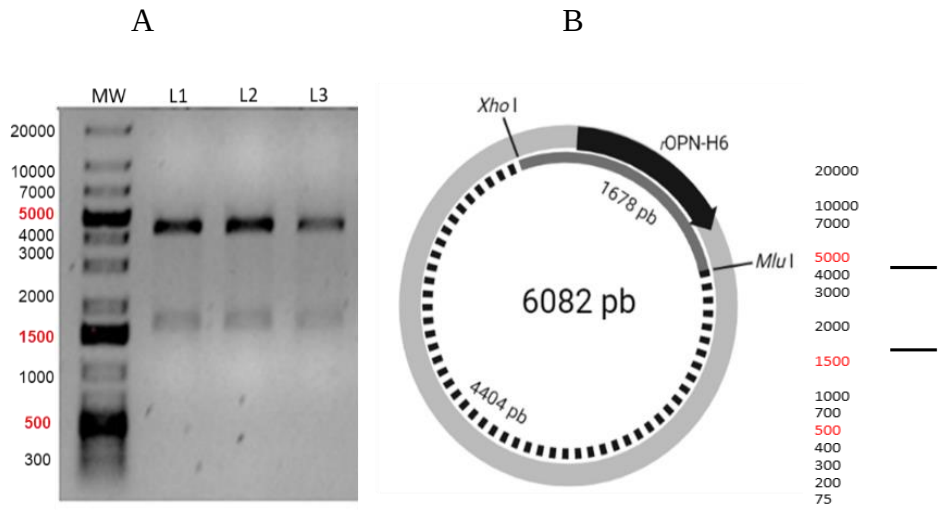


NOTA: El tamaño de cada fragmento visualizado en geles de agarosa al 0.8% corresponde a los tamaños esperados (A) y según el mapa de restricción del constructo pDAS-*r*aSFP-H6 (B y C). MW: Marcador de peso Gene Ruler (300-20000 pb); y L1: Plásmidos digeridos con las enzimas de restricción de las colonias.
Fuente: Brijaldo,2022.

Para el caso del constructo pET 28 (a+)-OPN-H6, se usaron las enzimas de restricción XhoI y MIUI en el ADN plasmídico extraído de las colonias transformadas en la cepa BL21STAR. El análisis de los fragmentos muestra la presencia de los cortes de interés teniendo en cuenta el peso

del vector de 6082 pb. Según las enzimas de restricción se obtuvieron dos fragmentos, uno de 4404 y otro de 1678 pb correspondiente al inserto (figura 11).

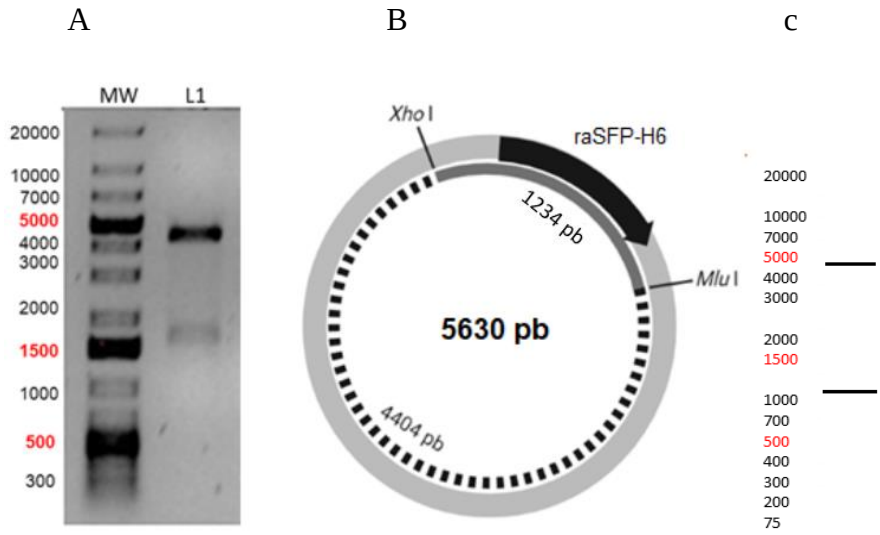
Figura 11. Digestión enzimática con XhoI y MluI de los plásmidos extraídos a partir de cultivos de colonias seleccionadas en placas de agar con Kanamicina



NOTA. El tamaño de cada fragmento visualizado en geles de agarosa al 0.8% (A) corresponde a los tamaños esperados según el mapa de restricción del constructo pET28(a+)-rOPN-H6 (B y C). MW: Marcador de peso Gene Ruler (300-20000 pb); y L1-L3: Plásmidos digeridos con las enzimas de restricción de las colonias.
Fuente: Brijaldo,2022.

Por su parte, para el constructo pET 28 (a+)-aSFP-H6 se usaron las mismas enzimas XhoI y MIuI en el ADN plasmídico extraído de las colonias con transformación positiva seleccionadas por plaqueo con antibiótico. El análisis de los fragmentos evidencia la presencia de los cortes de interés teniendo en cuenta el peso molecular del vector (5630 pb). Se obtuvieron dos fragmentos, uno de 4404 pb y el otro de 1234 pb correspondiente al mapa de restricción (figura 12).

Figura 12. Digestión enzimática con XhoI y MluI de los plásmidos extraídos a partir de cultivos de colonias seleccionadas en placas de agar con Kanamicina.

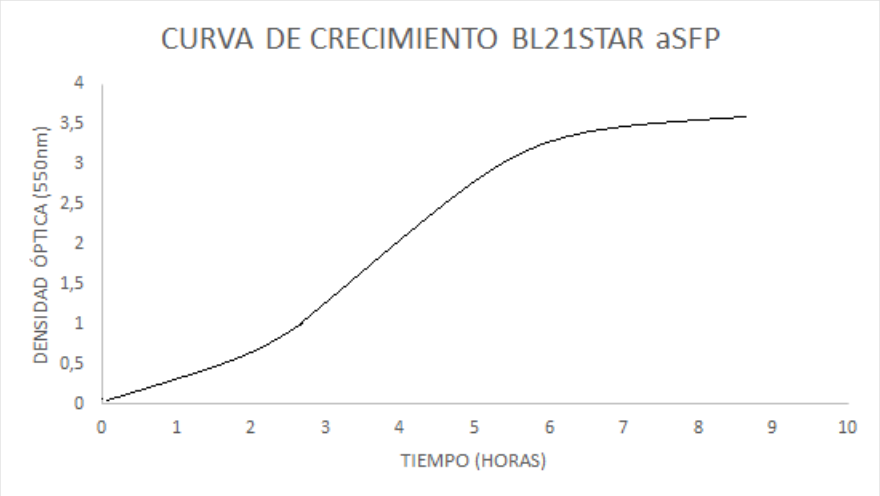


NOTA. El tamaño de cada fragmento visualizado en geles de agarosa al 0.8% (A) corresponde a los tamaños esperados según el mapa de restricción del constructo pET28(a+)-aSFP-H6 (B y C). MW: Marcador de peso Gene Ruler (300-20000 pb); y L1: Plásmidos digeridos con las enzimas de restricción de las colonias.
Fuente: Brijaldo, 2022.

Crecimiento de Células Transformadas

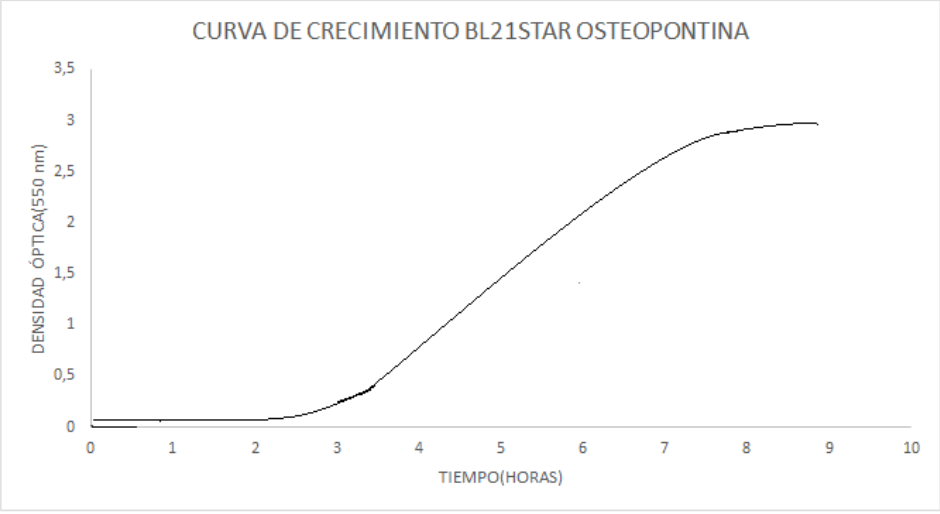
A traves de la curva de crecimiento de la cepa BL21STAR transformada con el constructo pET28(a+)-aSFP-H6 se estableció que el tiempo necesario para la cepa alcance su fase exponencial de crecimiento es a las 3 horas (OD_{550}=0.5) momento en el cual se realizó la inducción con IPTG (Figura 13). Para el caso de la cepa BL21STAR transformada con el constructo pET28(a+)-OPN-H6 se estableció que el tiempo necesario para la induccion con IPTG debia ser a las 3 horas ya que es el punto en el que el crecimiento bacteriano alcanza un OD_{550}=0.4 (Figura 14). Por último, la cepa de *Escherichia coli* BL21DE3 transformada con el constructo pDass-aSFP-H6 evidenció una fase exponencial de 2 horas y media, tiempo en el cual alcanzó una OD_{550}=0.5 (figura 15).

Figura 13. Cinética de Crecimiento de la Cepa de *E. coli* BL21STAR Transformada con el Plásmido pET28(a+)-raSFP-H6.



NOTA. Se midió la OD550 cada hora durante 9 horas para establecer el inicio de la fase exponencial y determinar el tiempo óptimo de inducción mediante IPTG para la producción de raSFP-H6.
Fuente: Brijaldo, 2022.

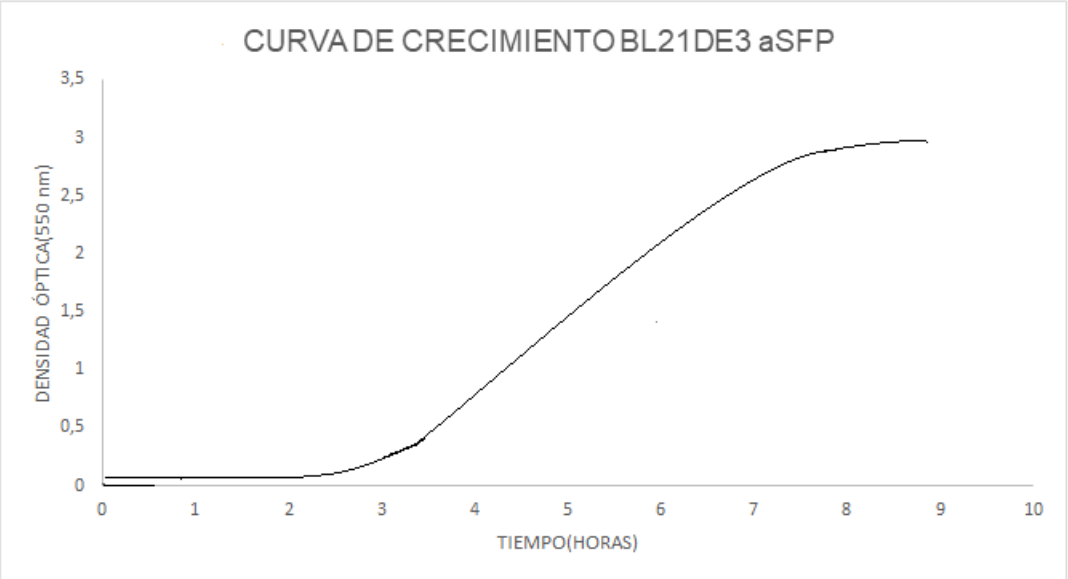
Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa de E. coli BL21STAR transformada con el plásmido pET28(a+)-rOPN-H6



NOTA. Se midió la OD550 cada hora durante 9 horas para establecer el inicio de la fase exponencial y determinar el tiempo óptimo de inducción mediante IPTG para la producción de rOPN-H6.

Fuente: Brijaldo,2022.

Figura 15. Cinética de crecimiento de la cepa de E. coli BL21 (DE3) ™ transformada con el plásmido pDAS-raSFP.

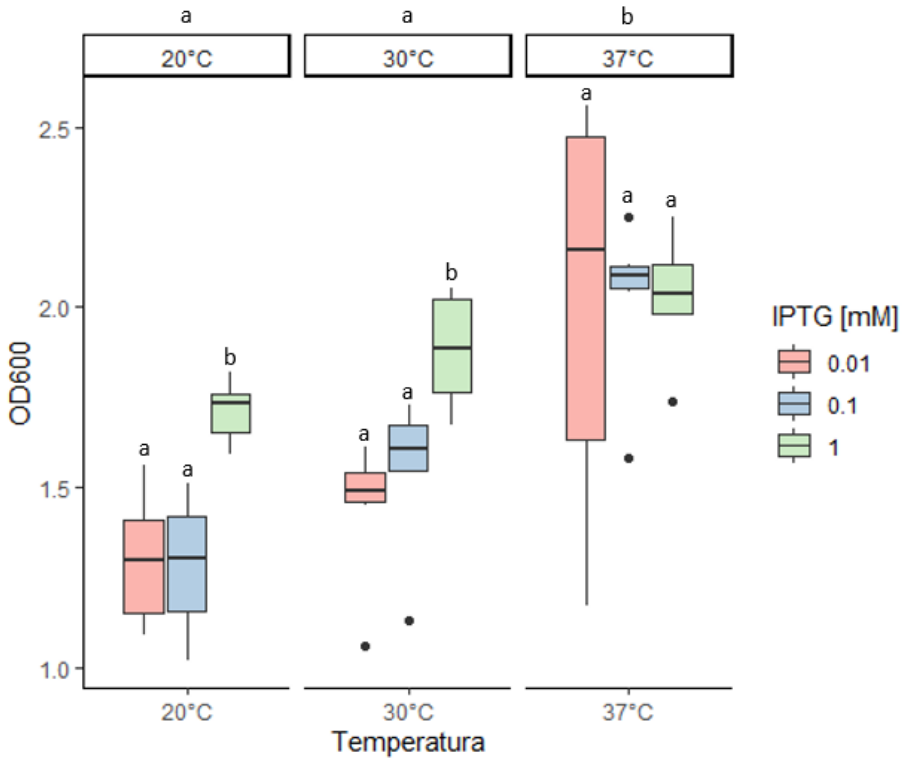


NOTA. Se midió la OD550 cada hora durante 9 horas para establecer el inicio de la fase exponencial y determinar el tiempo óptimo de inducción mediante IPTG para la producción de *r*aSFP.
Fuente: Brijaldo,2022.

Respecto al crecimiento pos-inducción, se evidenció que no hay un efecto muy determinante cuando se comparan las concentraciones de IPTG. Ademas, tampoco hay diferencias significativas en la producción de biomasa cuando se evaluan las temperaturas de crecimiento. Para el caso de la BL21STAR transformada con pET28(a+)-aSFP-H6 se observa que a 37°C con una concentración de 0.01 mM de IPTG hay mayor OD_{550} respecto a los otros tratamientos (Figura 16).

La menor tendencia de crecimiento de la cepa BL21DE3 se observa a 20°C con IPTG 0.1-0.01 mM. Se evaluaron tres pruebas, la prueba de normalidad de Shapiro Wilk debido a que la muestra era pequeña para conocer la distribución de los datos (p-value=0.37), la prueba de ANOVA para comparar las varianzas entre las medias y finalmente el test Turkey en conjunto para evaluar las temperaturas de comparaciones múltiples.

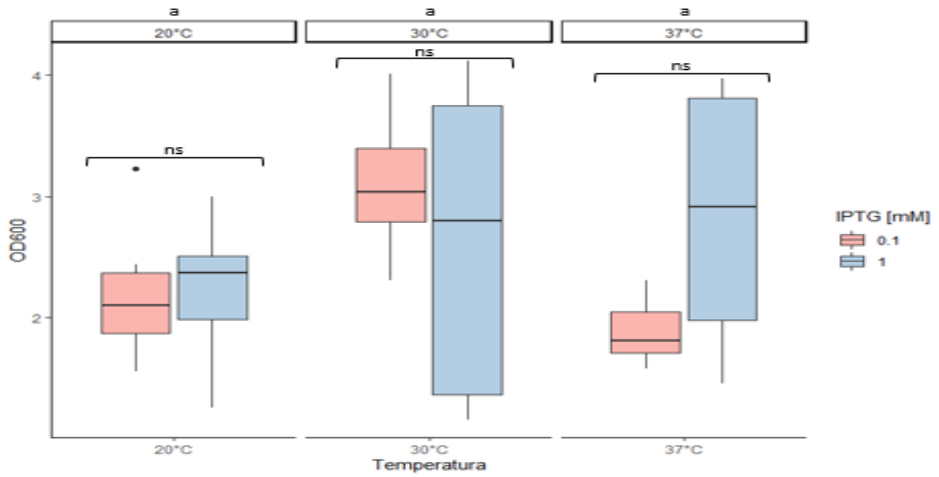
Figura 16. Comparación bacteriana en diferentes condiciones se realiza prueba de normalidad de Shapiro, una prueba ANOVA y un test Tukey de comparaciones múltiples.



NOTA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos se evalúan tres temperaturas 20-30-37°C y concentraciones de IPTG de 1-0.5-0.1-0.01 mM
Fuente: Brijaldo, 2022.

Para el caso de la cepa *E. coli* BL21STAR transformada con pET28(a+)-OPN-H6 se evidenció que no hay diferencias significativas entre los tratamientos con las condiciones empleadas de temperatura y concentración de inductor, todo esto enfocado a la producción de biomasa, sin tener en cuenta la producción de la proteína de interés (figura 17). Se realiza prueba de normalidad de Shapiro, el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y una prueba Post-hoc de Dunn para comparar entre temperaturas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. Se realiza la prueba no paramétrica Mann–Whitney–Wilcoxon para la comparación entre concentraciones. $\alpha = 0.05$, ns = No significativo.

Figura 17. Diferencias de crecimiento de BL21STAR (P < 0.05) transformada con pET28(a+)-rOPN-H6 luego de inducir la producción con IPTG a dos concentraciones (0.1 y 1.0 mM). Se realizaron pruebas de crecimiento a tres temperaturas (20, 30 y 37°C) y se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.



NOTA. Se realizaron pruebas de crecimiento a tres temperaturas (20, 30 y 37°C) y se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.
Fuente: Brijaldo, 2022.

En la gráfica de la figura 17 se observa la producción de rOPN-H6 donde se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro que nos indicó el tipo de distribución de los datos para posteriormente utilizar el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y una prueba Post-hoc de Dunn. Estos test utilizaron para corroborar la existencia de diferencias relevantes a nivel estadístico entre dos o más grupos de una variable independiente como las temperaturas de acuerdo con los datos obtenidos no se observan diferencias significativas indicando que la temperatura es independiente de la concentración de IPTG. Se realiza la prueba no paramétrica Mann–Whitney–Wilcoxon para la comparación entre concentraciones de IPTG no siendo significativo. $\alpha = 0.05$, ns = No

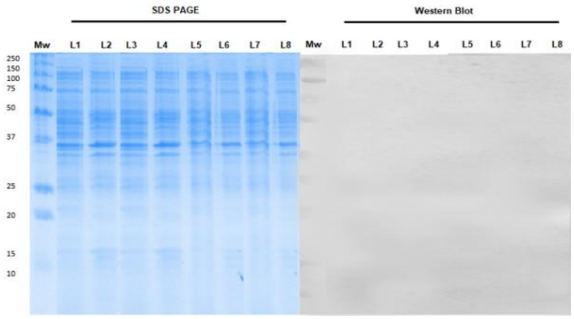
significativo. Los resultados evidenciaron que no hubo diferencias estadísticas significativas (p = 0.36) cuando se evaluó la OD550 al final de la producción. Se compararon los tratamientos entre la temperatura y la concentración de IPTG, sin embargo, cuando se realizó la detección de la proteína con el anticuerpo anti-His, se determinó que únicamente se obtuvieron cantidades detectables de rOPN-H6 con una producción a 37 °C, independientemente de la concentración de IPTG.

Determinación de las Condiciones Óptimas de Producción y Purificación para aSFP-H6 BL21DE3

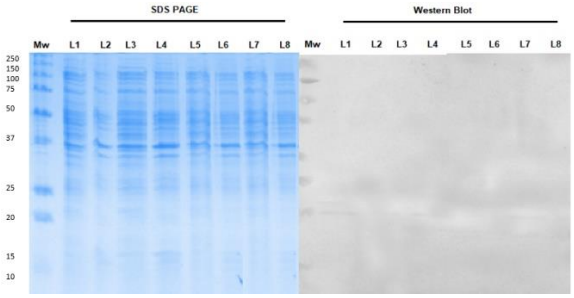
Empleando la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) *transformada con* pDASS-aSFP-H6 se estableció que el tiempo necesario para la induccion con IPTG es a las 2 horas y media ya que es el punto que tiene un crecimiento bacteriano de un OD 550 nm de 0.5. Una vez alacanzada la fase exponencial de crecimiento, se realizó la inducción y la producción se realizó a tres diferentes temperaturas asi como diferentes concentraciones de IPTG como inductor. La producción se evaluó mediante western blot. Para el caso de la raSFP-H6, la proteína se detectó mayormente en la fase soluble. Al evaluar la producción a 20 y 30 °C no se observa la producción de raSFP evidenciándose que las temperaturas no favorecen la generación de la proteína recombinante como se observa en la (Figura 18). La banda detectada a la altura de 15 kDa coincide con el peso reportado por Polo en el 2018, lo que confirma la presencia de la aSFP-H6 (Figura 19).

Figura 17. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las Fracciones Solubles (L1,L3, L5 y l7) e Insolubles (L2 , L4 ,L6 y L8) Extraídas de Cultivos de BL21 (DE3) ™, Transformadas con pDAS-raSFP de las Figura A y B.

A.

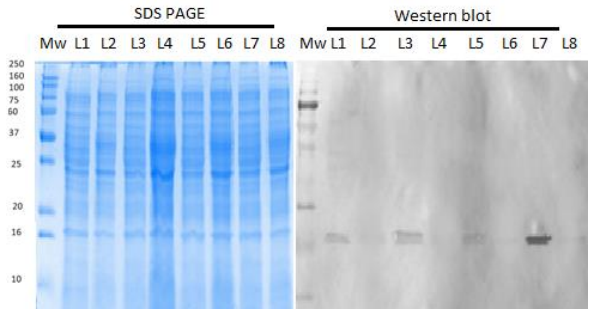


B.



NOTA Los Cultivos se realizaron a 20 y 30 °C (A) y (B) y la producción se realizó durante 3 h, previa inducción con IPTG 1 mM (L1 y L2) , 0.5 mM (L3 y L4) ,0.1 mM (L5 y L6) y 0.01 mM (L7 y L8). Mw: marcador de peso molecular con rango entre 10 y 250 kDa.
Fuente: Brijaldo, 2022.

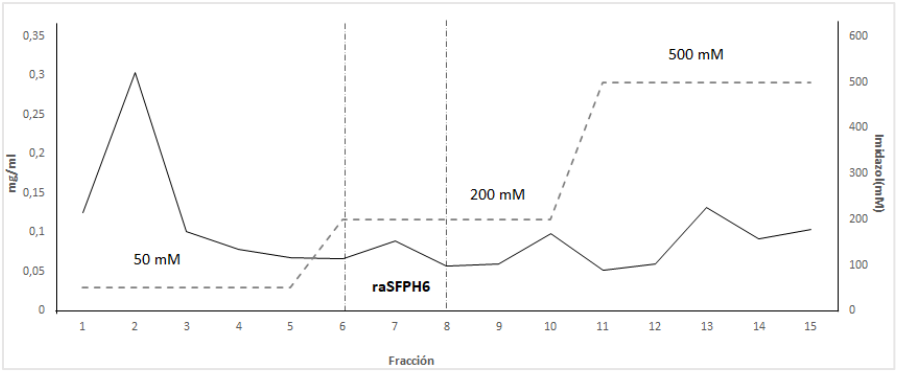
Figura 19. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las Fracciones Solubles (L1,L3, L5 y l7) e Insolubles (L2 , L4 ,L6 y L8) Extraídas de Cultivos de BL21 (DE3) ™, Transformadas con pDAS-raSFP.



NOTA Los Cultivos se Realizaron a 37 °C y la Producción se Realizó Durante 3 h, Previa Inducción con IPTG 1 mM (L1 y L2) , 0.5 mM (L3 y L4) ,0.1 mM (L5 y L6) y 0.01 mM (L7 y L8). Mw: Marcador de Peso Molecular con Rango entre 10 y 250 kDa.
Fuente: Brijaldo, 2022.

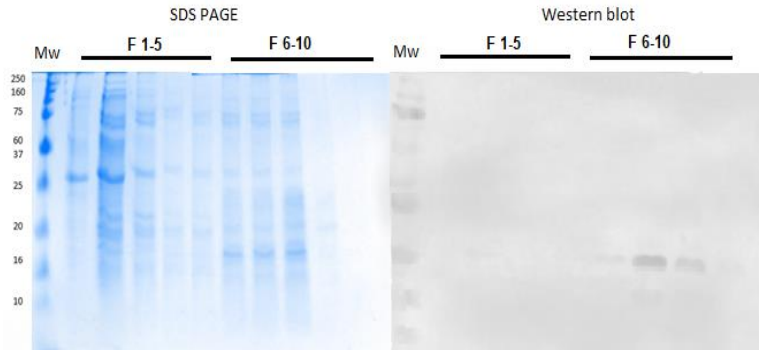
De acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones mas favorables para la expresion de raSFP-H6 en la cepa BL21(DE3) son 37°C e inducción con 0.01 mM de IPTG. Bajo estas condiciones se realizáron cultivos de 1 L y se purifició la proteína usando columnas de afinidad. Después de la elusión con diferentes concentraciones de Imidazol se observó la elusión de la proteína de interes a una concentración de 200 mM de imidazol en el pico dos lo que se comprobó con los geles SDS-PAGE y western blot (figuras 20 y 21).

Figura 20. Purificación por Afinidad al His Tag de Proteína raSFP en la Fracción Soluble del Pellet, Utilizando una Columna HisTrap HP (GE) Unida al Níquel.



Fuente: Brijaldo, 2022.

Figura 21. *Purificación de raSFP-H6 Mediante Columnas de Afinidad a la Histidina.*



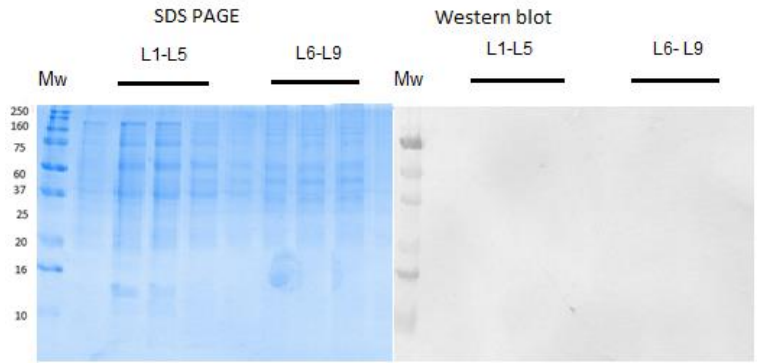
Nota. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las fracciones eluidas a través de la columna de afinidad. Mw: marcador de peso molecular con rango entre 10 y
Fuente: Brijaldo, 2022.

Adicionalmente, la proteína obtenida esta se purificó mediante columnas de afinidad, usando diferentes concentraciones de imidazol. Se determinó la cantidad de proteína en las fracciones eluídas con cada buffer para establecer el patrón de separación. Los resultados evidenciaron que la *r*aSFP-H6 eluyó en tres picos definidos cuando se usó buffer con imidazol 200 mM (Figura 20). Se realizaron cinco producciones y purificaciones bajo las mismas condiciones y se determinó que en promedio la producción de *r*aSFP-H6 es de 1.2 ± 0.04 mg/L después de purificar por afinidad.

Determinación de las Condiciones Óptimas de Producción y Purificación para aSFP-H6 BL21STAR

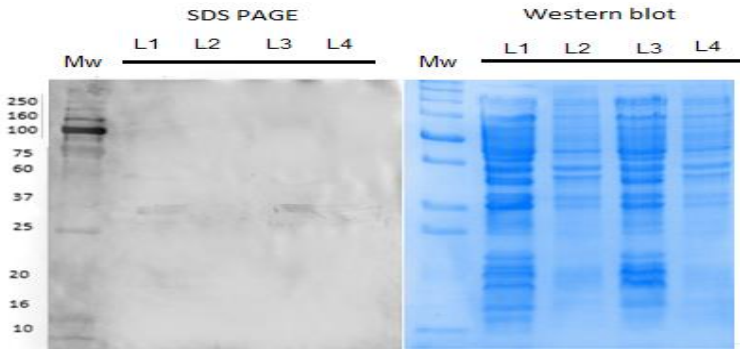
Por su parte, en las pruebas de expresión de aSFP-H6 cuando se hizo con la cepa BL21Star transformada con el plásmido pET28 a (+) no se evidenció cantidad detectable de la proteína de interes a 20 y 30°C. De nuevo a 37°C se evidenció la presencia de bandas especificas por el anti-his en la fase soluble con un peso de 35,2 kDa en ambas concentraciones de IPTG (Figuras 22 y 23).

Figura 22. Electroforesis SDS-PAGE y Detección por Western Blot de raSFP-H6 de las Fracciones L1 a L9 Extraídos de Cultivos BL21STAR, Transformadas con pET28(a+) raSFP-H6



NOTA. Los Cultivos se Realizaron a 20 °C con IPTG 1 mM L1-L4 y 30 °C con IPTG 0.1 mM L5-L9 . Mw: Marcador de Peso Molecular con Rango Entre 10 y 250 kDa.
Fuente:Brijaldo,2022.

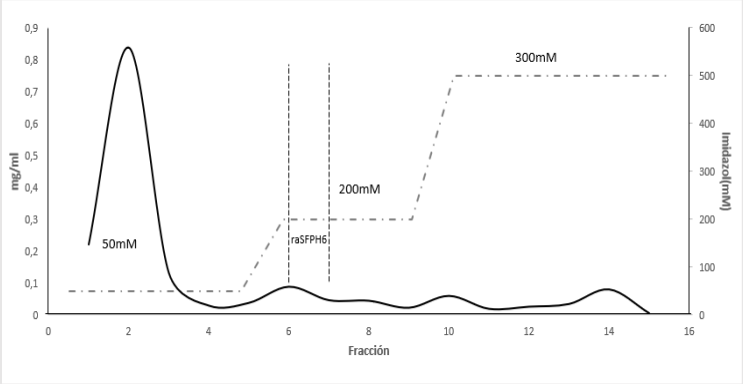
Figura 23. Electroforesis SDS-PAGE y detección por Western Blot de raSFP-H6 de las fraccio1 a L9 extraídos de cultivos BL21STAR, transformadas con pET28(a+) raSFP-H6.



NOTA. Los Cultivos se Realizaron a 37°C con IPTG 1 mM L1-L2 y 37°C con IPTG 0.1 mM L3-L4 . Mw: Marcador de Peso Molecular con Rango entre 10 y 250 kDa.
Fuente: Brijaldo, 2022.

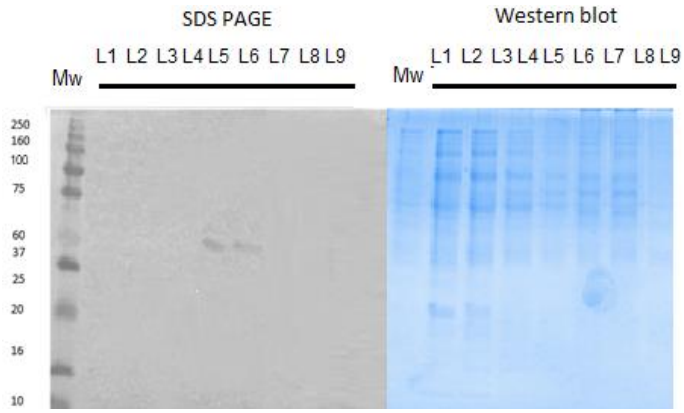
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se propuso las siguientes condiciones de expresión: incubación a 37°C tres horas con inducción a 1 Mm de IPTG para la producción de la aSFP-H6 en 1 L de cultivo. Luego de la producción a estas condciones se realizó la disrupción y la purificación. En la elución a traves de las columnas de afinidad, se evidenció la presencia en dos picos y la proteína detectada en western blot por anti his eluyo en el fraccion P1 y P2 a una concentración de imidazol de 200 mM (figuras 24 y 25). Sin embargo, el peso molecular de la banda no corresponde con el peso molecular teórico descrito para la aSFP-H6 lo que sugiere una dimerización de la proteína . Se realizaron cinco producciones y purificaciones bajo las mismas condiciones y se determinó que en promedio la producción de *r*aSFP-H6 es de 0.04 ± 0.04 mg/L después de purificar por afinidad. La cantidad obtenida de *r*aSFP-H6 no fue suficiente para el desarrollo de ensayos biológicos en semen descongelado.

F**igura 24**. Purificación por afinidad al His Tag de Proteína raSFP-H6 en la fracción soluble del pellet, utilizando una columna HisTrap HP (GE) unida al Niquel.



Fuente: Brijaldo, 2022.

Figura 25. *Purificación de raSFP-H6 Mediante Columnas de Afinidad a la Histidina.*



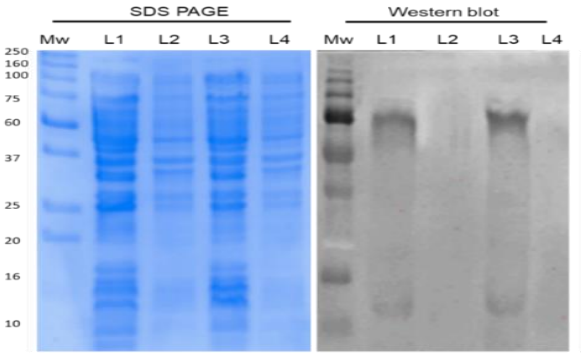
NOTA. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las fracciones eluidas a través de la columna de afinidad. Mw: marcador de peso molecular con rango entre 10 y 250 kDa.
Fuente: Brijaldo, 2022.

Determinación de las condiciones óptimas de producción y purificación para OPN-H6

Las pruebas de producción de rOPN-H6 se realizaron en tres temperaturas diferentes: 20 ,30 y 37 ° C; y dos diferentes concentraciones de inductor: 0.1 y 1.0 mM de IPTG. Los resultados evidenciaron que no hubo diferencias estadísticas significativas (p = 0.36) cuando se evaluó la

OD_{550} al final de la producción. Se compararon los tratamientos entre la temperatura y la concentración de IPTG (Figura 5). Sin embargo, cuando se realizó la detección de la proteína con el anticuerpo anti-His, se determinó que únicamente se obtuvieron cantidades detectables de rOPN-H6 con una producción a 37 °C, independientemente de la concentración de IPTG (Figura 26).

Figura 26. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las Fracciones Solubles (L1 y L3) e Insolubles (L2 y L4) Extraídas de Cultivos de BL21STAR, Transformadas con pET28(a+)-rOPN-H6.



NOTA. Los cultivos se realizaron a 37 °C y la producción se realizó durante 3 h, previa inducción con IPTG 0.1 mM (L1 y L2) y 1.0 mM (L3 y L4). Mw: marcador de peso molecular con rango entre 10 y 250 kDa.
Fuente: Brijaldo,2022.

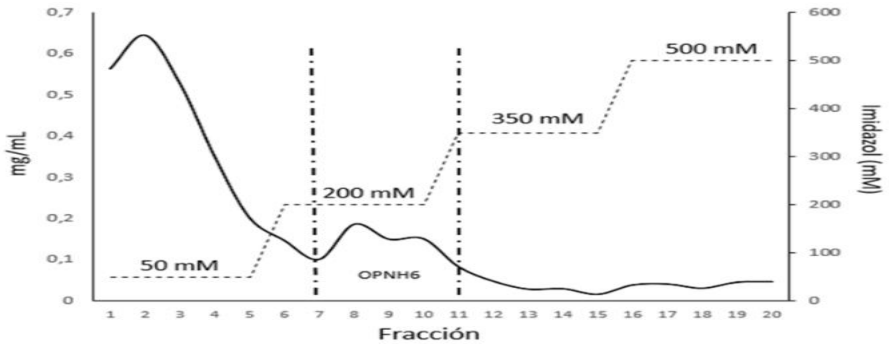
Adicionalmente, la proteína detectable solo se visualizó en las fracciones solubles en el Western Blot. Las membranas reveladas después de la transferencia evidenciaron la presencia de una banda cuyo peso molecular se calculó en 60 kDa (Figura 25).

Una vez se establecieron las mejores condiciones para la producción de *r*OPN-H6 soluble mediante su expresión en diferentes temperaturas, se realizaron las producciones a un volumen de 1L en incubación a 37 °C con 0.1 mM de IPTG. La proteína obtenida de estas se purificó mediante columnas de afinidad, usando diferentes concentraciones de imidazol. Se determinó la cantidad de proteína en las fracciones eluídas con cada buffer para establecer el patrón de separación. Los

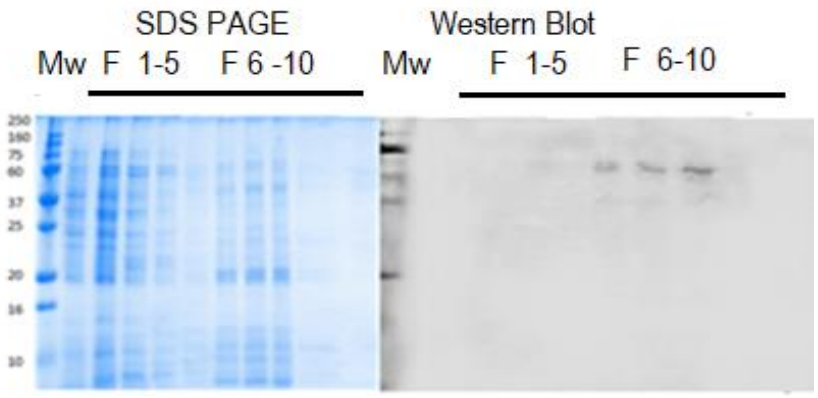
resultados evidenciaron que la *r*OPN-H6 eluyó en tres picos definidos cuando se usó buffer con imidazol 200 mM (Figura 26). Se realizaron cinco producciones y purificaciones bajo las mismas condiciones y se determinó que en promedio la producción de *r*OPN-H6 es de 0.11 ± 0.04 mg/L después de purificar por afinidad. La cantidad obtenida de *r*OPN-H6 no fue suficiente para el desarrollo de ensayos biológicos en semen descongelado.

Figura 27. *Purificación de rOPN-H6 Mediante Columnas de Afinidad a la Histidina.*

A.



B.



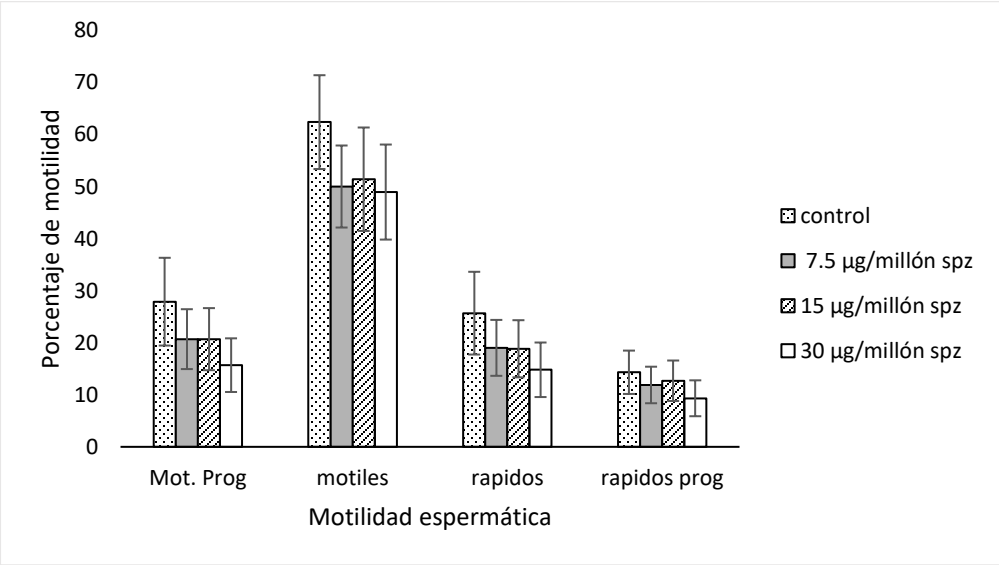
NOTA. A) Separación en fracciones usando diferentes concentraciones de imidazol, y
B) electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las fracciones eluídas
Fuente: Brijaldo,2022.

Adición de raSFP-H6 a Semen Descongelado

Se evalúo la calidad del semen descongelado e incubado a 37 °C durante una hora con la raSFP-H6 producida en pDASS y dializada en PBS. Se usó la proteína en concentraciones de 7.5, 15 y 30 µg/10^6 spz. Los resultados se compararon frente a un control descongelado e incubado el mismo tiempo, pero sin adición de proteína alguna. Luego de la incubación se midió la motilidad espermática en las variables de motilidad individual, motilidad progresiva, porcentaje de rápidos y rápidos progresivos. Respecto a la motilidad, los resultaron evidenciaron que no hubo efecto estadísticamente significativo por la adición de la raSFP-H6 en ninguna de las dosis adicionadas (figura 28). Aunque no hubo efecto significativo, la tendencia con la adición de raSFP-H6 fue hacia una disminución de la motilidad, disminución que se hizo más evidente a medida que aumentó la cantidad por millón de espermatozoides.

Se realiza prueba de normalidad de Shapiro y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para el análisis de los datos obtenidos de los crecimientos bacterianos en la cepa BL21STAR. De acuerdo con los resultados observados en la Figura 28, no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos y el control, de modo que se obtiene un p-value = 0.63 para los progresivos, p-value = 0.61 en el caso de los motiles, p-value = 0.64 para los rápidos y p-value = 0.64 para el caso de los rápidos progresivos. En todos los casos el porcentaje de motilidad fue mayor en el control que con cualquiera de las concentraciones de raSFP. Dado que la motilidad es medida en el término de respecto a la motilidad individual (un acercamiento de 400x en el microscopio), uno muy bueno está por encima de 80 %; el bueno, más de 60%; el regular, más de 40%, y el malo por debajo de este valor. Podemos inferir que el tratamiento con la proteína reduce la capacidad del parámetro de calidad.

Figura 28. Variables de Motilidad Espermática de Pajillas descongeladas e Incubadas durante una Hora a 37 °C con Diferentes Concentraciones de raSFP.

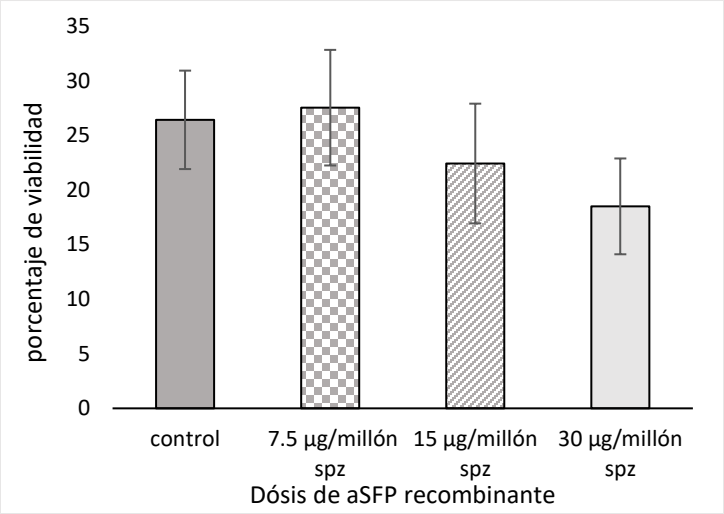


Fuente: Brijaldo, 2022

Por su parte, la medida de la viabilidad espermática, entendida como el porcentaje de células con membrana espermática integra, tampoco evidenció diferencias estadísticamente significativas (p-value =0.44). No obstante, se observa un leve aumento respecto a la viabilidad en el tratamiento con 7.5 ug/millón de aSFP en comparación con el control, lo que puede sugerir que dosis más bajas del tratamiento podrían mejorar la integridad celular. Se recomienda trabajar en esta hipótesis en el futuro.

Sin embargo, el control con OPTICELL evidencia porcentajes de mayor viabilidad que era más favorable que la proteína recombinante. Se deben tener en cuenta los demás tratamientos fueron numéricamente menores que el control (figura 29). Al observar el diagrama podemos determinar que el OPTICELL tiene el mayor porcentaje de viabilidad .Este parámetro de calidad nos permite saber el número de espermatozoides vivos, aunque no se muevan . Teniendo en cuenta que un porcentaje menor al 60% se considera que no hay una buena viabilidad.

Figura 29. Viabilidad espermática medida como porcentaje de espermatozoides con membrana espermática integra, en pajillas incubadas una hora a 37 °C con diferentes concentraciones de raSFP.



Fuente: Brijaldo, 2022

En el bioensayo de la proteína raSFP los resultados no fueron muy favorables en los parámetros de calidad, pero serian interesante a futuro tener en cuenta la concentración menor de 7.5µg para futuras investigaciones. Y realizar los ensayos durante el proceso de criopreservación y no post descongelación.

Discusión

Condiciones de producción en E. coli

Las proteínas aSFP y OPN son reconocidas por tener una importante influencia los procesos que lleva a cabo el espermatozoide bovino para lograr la fecundación. Adicionalmente, se han relacionado con la fertilidad del espermatozoide bovino y con la protección al efecto deletéreo derivado de los procesos de criopreservación (Bustamanete Filho, 2010; Junior et al., 2018). En vista de su importancia, este trabajó logró su producción de forma recombinante usando *E. coli* como fábrica celular. Para lograr esto se empleó *E. coli* debido a su reconocida versatilidad genética, costo de los medios y rápido crecimiento (García-Fraga et al., 2015). Esta capacidad de producir la proteína en altas concentraciones de forma más rápida se logró través de la inserción de la secuencia codificante en las células bacteria por medio de un vector de expresión que posee un promotor, dos terminadores y resistencia a un antibiótico. Para el caso de la aSFP se emplearon dos diferentes vectores: pDass y pET 28, ambos inducibles por IPTG. En el caso del pDass-aSFP6, se usó para transformar la cepa BL21(DE3). El plásmido pDass posee una señal de translocación a periplasma para ayudar con la formación de puentes disulfuro gracias al ambiente oxidativo del periplasma, produciendo una proteína más semejante a la nativa lo que podría suponer también una actividad biológica semejante. Adicionalmente, en el espacio periplasmático se disminuye la posibilidad de degradación proteolítica debido a que hay menos proteasas permitiendo la acumulación en el compartimiento periplasmático, lo que favorece su purificación (Selas Castiñeiras et al., 2018). En este sentido, los resultados obtenidos fueron satisfactorios al expresar la proteína aSFP en *E. coli* BL21DE3 cuando se realizó la producción a 37 °C y 0.01 mM de IPTG.

Para el caso del plásmido pET28, este expresa los genes mediante un promotor T7 y lacUV5, lo cual quiere decir que la expresión de la T7 RNA polimerasa se induce al agregar lactosa

o isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG), que no es metabolizado por la bacteria, manteniéndose constante durante el tiempo que se demore la inducción. Aunque se ha descrito que la temperatura óptima de crecimiento para *E. coli* es de 37 °C, existen reportes en los que se describe que la temperatura, así como las concentraciones de IPTG, influyen en correcto plegamiento de las proteínas recombinantes (F. Rueda et al., 2014). Así, temperaturas de producción de 30 a 37 °C pueden determinar si la proteína se produce mayormente en forma soluble o insoluble, en cuyo caso tiende a formar agregados también llamados cuerpos de inclusión. Estos últimos son producto del mal plegamiento de las proteínas que en muchas ocasiones se presenta por que se presiona la maquinaria celular y la velocidad de traducción es mucho mayor a la que pueden actuar los mecanismos de control de calidad celular (chaperonas y proteasas) (Rosano & Ceccarelli, 2014). Adicionalmente, el uso de IPTG como inductor altamente especifico parece también tener un efecto sobre la solubilidad de las proteínas. Algunos trabajos describen que altas concentraciones de IPTG aceleran la maquinaria celular, disminuyendo la concentración de la proteína recombinante y a su vez la estabilidad del transcrito, generando plegamientos incorrectos (Casadaban & Martinez-arias, 1983; Gausing et al, 1977; Jinks-Robertson et al., 1983; Nilsson et al., 1987; Wood & Peretti, 1991). Sin embargo, para las proteínas aSFP-H6 y OPN-H6, producidas en este trabajo bajo las condiciones descritas, la mejor temperatura de producción fue 37 °C con producción mayoritariamente soluble sin efecto apreciable de las concentraciones de IPTG. Al respecto, los trabajos que han expresado aSFP y OPN en *E. coli*, reportan mayor cantidad de agregados insolubles como cuerpos de inclusión respecto a la proteína soluble (Bustamanete Filho, 2010), lo que ha hecho necesaria la introducción de protocolos de solubilización adicionales usando urea altamente concentrada. Estudios realizados en producción de aSFP recombinante se han realizado usando el vector pET 23(a+) en BL21 pLysS inducida con IPTG 0.5Mm por 3 horas sin resultados positivos en cuanto a proteína soluble y con abundante formación de agregados (I.

Bustamante-Filho et al., 2014). En nuestro caso, la producción se decantó hacia la fracción soluble, probablemente debido a la optimización de codones para *E. coli*. Al respecto, se ha descrito que la optimización del uso de codón de *E. coli* en la producción de proteínas heterólogas favorece la solubilidad en la expresión, debido a que elimina la presencia de codones "raros" favoreciendo la eficiencia en la traducción (Retnoningrum et al., 2012).

Por su parte, la selección de la cepa BL21 parece también tener influencia en la solubilidad de las proteínas producidas. Esta cepa de *E. coli* presenta una mutación en el gen ARNasa E (*rne*131), lo que disminuye la degradación del ARNm y provoca una estabilidad de los transcritos y la producción de proteínas (García-Fraga et al., 2015). A pesar de que BL21STAR carece de los genes de las proteasas *Omp*T e *lon* (Ono et al., 2007), la mayor cantidad de proteínas raSFP-H6 y rOPN-H6 se observó en la fase soluble.

Por último, la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* presenta una desventaja en cuanto a las modificaciones post-traduccionales. Aunque en el caso de la aSFP no se han descrito glicosilaciones u otra modificación luego de su síntesis (Romão et al., 1997), la OPN posee 28 sitios de fosforilación y 3 sitios de O-glucosilación (Sørensen & Mortensen, 2005) lo cual debe ser muy tenido en cuanta en posteriores trabajos que involucren ensayos biológicos con OPN recombinante.

Purificación en columnas de afinidad a la histidina

Respecto a la purificación de las proteínas recombinantes mediante las columnas de afinidad, la elución de ambas proteínas se evidenció con el uso de imidazol 200 mM en dos picos con patrones semejantes de elución. Lo anterior sugiere alguna diferencia estructural cuando se produjeron en BL21STAR (con pET28 a+). Adicionalmente, las bandas detectadas a través de

Western Blot presentaron pesos moleculares calculados como el doble del peso molecular teórico de cada proteína. Esto sugiere que raSFP-H6 y rOPN-H6, producidas bajo las condiciones descritas, podría tener cierta tendencia a la dimerización. Sin embargo, esto no se evidenció en aSFP cuando se produjo en BL21(DE3) con el plásmido pDass. Esta dimerización podría ser producto de una interacción entre las colas de histidinas (6x His) con alguna parte de la estructura primaria. Al respecto se ha descrito que la presencia de la cola de histidinas puede mediar dimerizaciones (Haglin et al., 2017), y esta organización no afecta la arquitectura de complejos peptídicos ayudando a la estabilidad y función de proteínas, propiedad que incluso puede ser aprovechada en la producción de proteínas de auto-ensamble con tendencia a formar nanopartículas funcionales (F. Rueda et al., 2015). Todas estas características deben ser tenidas en cuenta en futuras investigaciones. Dado que la traslocación al periplasma contribuye con la formación de puentes disulfuro por el ambiente oxidativo del periplasma, esto puede resultar en una conformación estructural más cercana a la nativa que no permite la dimerización de la proteína a pesar de contener también la cola de histidinas, lo que a su vez puede favorecer no solo la purificación sino también una eventual mejor actividad biológica.

De otro lado, la purificación y posterior recuperación de la aSFP-H6 producida en BL21(DE3) evidenció cantidades de cerca de 1.2 mg/L en forma soluble, mientras y OPN-H6 producidas en BL21STAR arrojaron cantidades de 0.1 mg por cada litro de cultivo respectivamente. Aunque estas cantidades dependen en un alto grado de la naturaleza de la proteína, algunos autores reportan cantidades muy superiores de proteínas recombinantes de diferente naturaleza que van desde los 5 hasta los 34 mg por 50 mL de cultivo cuando se usan estrategias similares a las realizadas en este trabajo empleando la optimización de codones, uso de cepas especializadas y control de condiciones de expresión (Sivashanmugam et al., 2009). Sin embargo, un escalamiento en biorreactores en el que se pueda aumentar la biomasa y conseguir un

control más fino de las condiciones de crecimiento, pH de los medios y condiciones de crecimiento, así como la optimización de las condiciones de la purificación, podría aumentar su producción de cara a procesos industriales.

Ensayo de actividad biológica

Respecto al ensayo biológico, infortunadamente no se logró obtener suficientes cantidades de rOPN-H6 para realizar pruebas de actividad biológica con esta proteína. Para el caso de la raSFP-H6, aunque no hubo un efecto apreciable al incubar espermatozoides descongelados con las diferentes dosis, si hubo una tendencia a disminuir la motilidad a medida que se incrementó la cantidad de proteína adicionada. Al respecto, se ha descrito que la aSFP tiene una participación en la regulación de la función mitocondrial (I. Bustamante-Filho et al., 2014). En su estado nativo, la aSFP se une al espermatozoide después de la eyaculación, localizándose en la parte media de la célula espermática, lugar en donde se localizan las mitocondrias. Esta regulación de la función mitocondrial se relaciona con la motilidad espermática de manera directa, pues es en movimiento que el espermatozoide gasta la mayor parte de su energía (Schoneck et al., 1996). En este sentido, se ha propuesto que la aSFP inhibe la función motora del espermatozoide de manera exógena, impidiendo que gaste la energía antes del encuentro con el ovocito, en donde tiene que sufrir procesos de activación e hipermotilidad para atravesar las células del cumulus y realizar la fecundación, procesos que requieren de un gasto energético importante. De acuerdo con lo anterior, es posible que la adición de raSFP esté ejerciendo precisamente un efecto inhibidor de la motilidad espermática cuando se adiciona a espermatozoides descongelados.

Al respecto, se ha descrito que espermatozoides ovinos incubados en pre-congelación empleando 65 µM de la proteína SPINK3 (Inhibidor de serino-proteasas Kazal tipo 3) recombinante,

evidencian una mejora en la motilidad la capacidad de atravesar el moco cervical y la interacción con al ácido hialurónico (Greco et al., 2019). Esta SPINK3 es una pequeña proteína sintetizada en las vesículas seminales y secretadas al plasma seminal que inhibe la entrada de calcio y evita la capacitación prematura, lo cual sugiere que debería ser incluida en estudios que involucren regulación de la motilidad espermática en espermatozoides. Sin embargo, hasta el momento no se ha detectado proteínas semejantes en plasma seminal bovino.

Por su parte, aunque se ha demostrado que la raSFP tiene un efecto protector contra el estrés térmico y oxidativo, en este estudio no se evidencia efecto protector. Lo anterior probablemente debido a que las proteínas fueron adicionadas en la descongelación y no durante el proceso de criopreservación. Esto obedeció a que la cantidad de raSFP que se pudo obtener después de varios procesos de producción y purificación no fue suficiente para adicionarla en el medio crioprotectante. De esta manera, es posible que adicionar la raSFP directamente en el medio durante el proceso de criopreservación tenga un efecto más claro sobre la calidad seminal post-descongelación en pajillas de espermatozoides bovinos.

Conclusiones

La importancia de las proteínas del plasma seminal bovino en biotecnología reproductiva continúa siendo reconocida en grupos de investigación a nivel global. El estudio de estas proteínas es de especial importancia no solo para dilucidar definitivamente los mecanismos moleculares y celulares de su actividad biológica, sino para el desarrollo y optimización de herramientas biotecnológicas que contribuyan a aumentar los índices de fertilidad y la eficiencia de tecnologías como la criopreservación. En este sentido, la importancia de las proteínas aSFP y OPN ha sido ampliamente reconocida y los resultados que se presentan en este trabajo demuestran la mejor

forma de expresarlas de forma recombinante y purificarlas en condiciones de laboratorio cuando se usa *Escherichia coli* como fábrica celular bacteriana. De forma interesante, ni la temperatura ni las concentraciones de IPTG influenciaron la formación de agregados y se obtuvo la proteína recombinante en su mayoría soluble. Lo anterior también puede atribuirse a las estrategias de producción que tienen que ver con la selección de cepas, vectores y optimización de codones para *E. coli*. La obtención de raSFP-H6 y rOPN-H6 de forma mayoritariamente soluble, no solo representa una ventaja en términos de producción y purificación, sino que abre las puertas para un estudio más detallado de su estructura y función.

Respecto al uso de la cola de histidinas, esta representa una parte importante en la purificación de las proteínas recombinantes. Sin embargo, para el caso de la raSFP-H6 y la rOPN-H6 producidas en la cepa BL21STAR, parece tener una influencia estructural que tiene un efecto de dimerización. Lo anterior hace que, según las características estructurales de la aSFP-H6, la cepa BL21(DE3) sea más adecuada para su producción cuando se usa un plásmido de traslocación periplasmática producida a 37 °C y 0.01 mM de IPTG.

Respecto a los ensayos de la aSFP con espermatozoides, su efecto en la disminución de la motilidad espermática podría ser de utilidad para procesos en los que se requiera un ahorro energético y que la célula espermática no tenga un desgaste prematuro, como procesos de fertilización *in vitro.* Sin embargo, estos ensayos se deben optimizar y profundizar en estudios posteriores.

Por último, las cantidades obtenidas después de la purificación, en las condiciones planteadas, representa un importante primer paso en el camino para el desarrollo de un biotecnológico que pueda aumentar la eficiencia de herramientas biotecnológicas de uso frecuente en la reproducción bovina. Todo esto en conjunto hace que valga la pena el planteamiento de

futuros experimentos que involucren el uso de raSFP-H6 y rOPN-H6 en procesos de criopreservación espermática, fertilización *in vitro* y producción de embriones bovinos de alto valor genético.

Consideraciones y Recomendaciones

Este proyecto buscó establecer un nuevo estudio de las proteínas recombinantes del plasma bovino seminal, enfocado en la expresión de las proteínas en diferentes cepas de *E. coli* analizando la concentración de IPTG y temperatura y determinar la mejor opción. Estas proteínas tienen el potencial de mejorar la viabilidad y motilidad espermática en los procesos de criopreservación. Se sugiere realizar estudios biológicos que involucren más proteínas del plasma seminal producidas de forma recombinante partiendo de las condiciones descritas en el presente trabajo. Así mismo se sugiere que los ensayos biológicos se realicen adicionando las proteínas recombinantes directamente en los medios de criopreservación antes de someter a los espermatozoides al efecto deletéreo de la congelación para determinar su efecto protector.

Referencias

A, Franzen .D, H. . (1985). Aislamiento y caracterización de dos sialoproteínas presentes solo en bovinos calcificadosmatriz. *Biochem*, *232*(3), 715–724.

Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive Oxygen Species and Sperm Function--In Sickness and In Health. *Journal of Andrology*, *33*(6), 1096–1106. https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535

Alvarez-gallardo, H., Kjelland, M. E., Moreno, J. F., Jr, T. H. W., Lara-sagaho, A. V, Randel, R. D., Lammoglia, M. A., Pe, M., Romo, S., & Espero, E. (2013). Gamete Therapeutics : Recombinant Protein Adsorption by Sperm for Increasing Fertility via Artificial Insemination. *PLoS ONE*, *8*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065083

Anghel, A., Zamfirescu, S., Coprean, D., & Palas Constanta, I. (2013). The Oxidative Stress, Cryoconservation and Fertility. Aspects of Molecular Oxidation and its Effects on the Reproductive Functions off Ram. *Academy of Romanian Scientists Annals Series on Biological Sciences Academy of Romanian Scientists Annals -Series on Biological Sciences*, *2*(1), 73–104.

Archibong, A. E., Petters, R. M., & Johnson, B. H. (1989). Development of porcine embryos from one- two-cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biology of Reproduction*, *41*(6), 1076–1083. https://doi.org/10.1095/biolreprod41.6.1076

Ardon, F., & Suarez, S. S. (2013). Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. *Reproduction*, *146*(2), 111–117. https://doi.org/10.1530/REP-12-0468

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., & Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación TT - Basic points in

cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, *57*(4), 291–300. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf

Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, *21*(1), 1–7.

Bains, R., Sc, B., Adeghe, J., Ph, D., Carson, R. J., & Ph, D. (2002). *Human sperm cells express CD44*. *78*(2), 307–312.

Barrios, B., Pe, R., Gallego, M., Muin, T., & Cebria, A. (2000). *Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane 1 and Jose*. *1537*, 1531–1537.

Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (2000). Seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *International Journal of Andrology*, *24*(6), 352–359. https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2001.00315.x

Becerra, Daniel , Benedetti, I. (2018). La (OPN) se comporta como un buen indicador de riesgo cerebrovascular en pacientes con placa carotídea, a pesar de que sus niveles y los mecanismos moleculares de expresión no están del todo aclarados. *REVISTA CIENCIAS BIOMÉDICAS*, 15–21.

Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., & Manjunath, P. (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, *71*(4), 461–470. https://doi.org/10.1002/mrd.20310

Boccia, L., Di Francesco, S., Neglia, G., De Blasi, M., Longobardi, V., Campanile, G., & Gasparrini, B. (2013). Osteopontin improves sperm capacitation and in vitro fertilization efficiency in buffalo (Bubalus bubalis). *Theriogenology*, *80*(3), 212–217. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.017

Brown, L. F., Berse, B., Van de Water, L., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C. A., Manseau, E. J., Dvorak, H. F., & Senger, D. R. (1992). Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Molecular Biology of the Cell*, *3*(10), 1169–1180. https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1169

Bustamanete Filho, I. C. (2010). Cloning, expression and purification of proteins from bovine seminal plasma related with semen freezability [Universidade Federal do Rio Grande do sul.]. In *Science*. http://hdl.handle.net/10183/23020

Bustamante-Filho, I. C., Renato Menegassi, S., Ribas Pereira, G., Dias Salton, G., Mosena Munari, F., Roberto Schneider, M., Costa Mattos, R., Otávio Jardim Barcellos, J., Pereira Laurino, J., Obino Cirne-Lima, E., & Inês Mascarenhas Jobim, M. (2021). Bovine seminal plasma osteopontin: Structural modelling, recombinant expression and its relationship with semen quality. *Andrologia*, *53*(1), 1–15. https://doi.org/10.1111/and.13905

Bustamante-Filho, I., Salton, G. D., Munari, F. M., Schneider, M. R., Mattos, R. C., Laurino, J. P., Cirne-Lima, E. O., & Jobim, M. I. M. (2014). Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. *Animal Reproduction*, *11*(2), 96–103.

C. Schoneck, l J. B. 2 and R. E. la. (1996). Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, *95*, 633–642. https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00409-2

Cancel, A.M., D.A. Chapman, G. J. K. (1999). Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Reproductive Tract. Biol*, *60*(2), 454–460.

Cardozo, J. A. (2008). La Proteómica una vía molecular en el estudio de la fertilidad del espermatozoide. *Researchgate*. https://www.researchgate.net/publication/297007289 La proteomica una via molecular en el estudio de la fertilidad del espermatozoide.

Cardozo, J. A., Grasa, P., Muriño, M. T., & Cebrián, J. Á. (2009). Adición de proteínas del

plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, *10*(1), 51–59. https://doi.org/10.21930/rcta.vol10_num1_art:128

Casadaban, B. M. J., & Martinez-arias, A. (1983). B-Galactosidase Gene Fusions for Analyzing Gene Expression in Escherichia coli and Yeast. *Gene*, *100*(1979).

Chantler, E., & Abraham-Peskir, J. V. (2004). Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia*, *36*(2), 87–93. https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2004.00609.x

Cichy, J., & Puré, E. (2003). The liberation of CD44. *The Journal of Cell Biology*, *161*(5), 839–843. https://doi.org/10.1083/jcb.200302098

Craig, D., Gao, M., Schulten, K., & Vogel, V. (2004). *Structural Insights into How the MIDAS Ion Stabilizes Integrin Binding to an RGD Peptide under Force*. *12*, 2049–2058. https://doi.org/10.1016/j.str.2004.09.009

D'Cruz, O. J. (1996). Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: Relevance to infertility. *Front Biosc*, *1*(August), 161–176.

De Souza Castelo, T., Rodrigues Frota, T., & Rodrigues Silva, A. (2008). *Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos.* (Issue 3).

Denhardt1, D. T., Giachelli, C. M., & Rittling, and S. R. (2001). Role of Osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Pharmacol and Toxicology*, *41*(1), 723–749.

Dostälovä, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., Hettel, C., Riedel, D., Schöneck, C., & Einspanier, R. (1994). *Immunolocalization and Quantitation of Acidic Seminal Fluid Protein (aSFP) in Ejaculated , Swim-up , and Capacitated Bull Spermatozoa*. *375*(July), 457–461.

Dostàlovà, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., Hettel, C., Riedel, D., Schöneck, C., Einspanier, R., & Töpfer-Petersen, E. (1994a). Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid

protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, *375*(7), 457–461. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7945995

Dostàlovà, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., Hettel, C., Riedel, D., Schöneck, C., Einspanier, R., & Töpfer-Petersen, E. (1994b). Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, *375*(7), 457–461.

Druart, X., Rickard, J. P., Tsikis, G., & de Graaf, S. P. (2019). Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology*, *137*, 30–35. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.034

E. Topfer-Petersen', A. Romero', P. F. Varela', M. Ekhlasi-Hundrieser', Z. Dostalova', L. S. and, & Calvete', J. J. (1998). Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, *224*, 217–224.

Eckert, R. L., Kaartinen, M. T., Nurminskaya, M., Belkin, A. M., Colak, G., Johnson, G. V. W., & Mehta, K. (2014). Transglutaminase regulation of cell function. *Physiological Reviews*, *94*(2), 383–417. https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2013

Eduardo, C., Souza, A., Moura, A. A., & Killian, G. J. (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*. *105*, 72–89. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.027

F.S. Esch, N.C. Ling, P. Btlhlen, S. Y. Y. and R. G. (1983). Primary structure of pdc-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, *113*(3), 240. https://doi.org/10.1016/0006-291x(83)91078-1

Fan, J., Lefebvre, J., & Manjunath, P. (2006). *Bovine seminal plasma proteins and their*

relatives : A new expanding superfamily in mammals. *375*, 63–74. https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.02.025

Gabler, C., Chapman, D. A., & Killian, G. J. (2003). Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction*, *126*(6), 721–729. https://doi.org/10.1530/rep.0.1260721

García-Fraga, B., da Silva, A. F., López-Seijas, J., & Sieiro, C. (2015). Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *38*(12), 2477–2486. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1485-5

Gausing, K. (1977). Regulation of ribosome production in Escherichia coli: Synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *Journal of Molecular Biology*, *115*(3), 335–354. https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90158-9

Greco, M.B.1*, Nicolli, A., 1, , Hozbor, F. ., , Ledesma, A. ., , Soler, A. J. ., , Zalazar, L. ., & y Cesari, A. . (2019). Efecto de la proteína SPINK3 sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides de carnero criopreservados. *REVISTA ARGENTINA DE PRODUCCIÓN ANIMAL*, *VOL 39*(SUPL. 1), 169–184.

Haglin, E. R., Yang, W., Briegel, A., & Thompson, L. K. (2017). His-Tag-Mediated Dimerization of Chemoreceptors Leads to Assembly of Functional Nanoarrays. *Biochemistry*, *56*(44), 5874–5885. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00698

Henao Uribe, F. J., Valencia Giraldo, J., Mesa, H., & Gómez Londoño, G. (2016). Effect of seminal plasma and sperm of boars valued by freezability on seminal cryopreservation. *Revista Facultad Nacional de Agronomia Medellin*, *69*(2), 7903–7910. https://doi.org/10.15446/rfna.v69n2.59135

I Thérien .Moreau, R., & Manjunath, P. (1999). Bovine Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Stimulate Phospholipid Efflux from Epididymal Sperm 1. *Biology of Reproduction*, *598*, 590–598.

Iwasaki, A., & Gagnon, C. (1992). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*, *57*(2), 409–416.

Jinks-Robertson, S., Gourse, R. L., & Nomura, M. (1983). Expression of rRNA and tRNA genes in Escherichia coli: Evidence for feedback regulation by products of rRNA operons. *Cell*, *33*(3), 865–876. https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90029-6

Jobim, M.I., R. Macedo, R. C. M. (2009). Marcadores protéicos de fecundacióne no plasma seminal e na membrana plasmática. *Rev Bras Reprod Anim Supl.*, *6*, 11–19.

Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Cimarosti HI, M. R. . (2002). Albúmina y osteopontina -proteínas plasmáticas seminales bovinas relacionadas con la congelabilidad del semen . *Rev Bras Reprod Anim*, *26*, 296–305.

John .R, A., & Mark.A, B. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *250*(1–2), 66–69. https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026

John, A., & Helen, F. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. *BioEssays*, *16*(4), 259–267. https://doi.org/10.1002/bies.950160409

Junior, A. R. P., Tilburg, M. F. Van, Lobo, M. D. P., Monteiro-moreira, A. C. O., Moreira, R. A., Melo, C. H. S., Souza-fabjan, J. M. G., Araújo, A. A., & Melo, L. M. (2018). Proteomic analysis of follicular fl uid from tropically-adapted goats. *Animal Reproduction Science*, *188*(November 2017), 35–44. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.11.005

Kaji, K., & Kudo, A. (2002). *Focus on Fertilization The mechanism of sperm – oocyte fusion in*

mammals. https://doi.org/10.1530/rep.1.00163

Kerr, J. M., Fisher, L. W., Termine, J. D., & Young, M. F. (1991). The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin. *Gene*, *108*(2), 237–243. https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90439-I

Lara, Á. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en Escherichia coli. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *10*(2), 209–223. www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=pt&tlng=es.

Leblond, E., Desnoyers, L., & Manjunath, P. (1993). Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, *34*(4), 443–449. https://doi.org/10.1002/mrd.1080340414

Leonardo, F., & Alfonso, R. (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 Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la integridad d*. Universidad Nacional.

Lindsey, A. C., Schenk, J. L., Graham, J. K., Bruemmer, J. E., & Squires, E. L. (2010). Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, *34*(2), 121–127. https://doi.org/10.2746/042516402776767321

Lozano Benito, D., Gil Huerta, L., & Álvarez San Martín, C. (2011). Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado. *Sanid. Mil.*, *67*(3), 284–290. https://doi.org/https://dx.doi.org/10.4321/S1887-85712011000400005 .Pag 290-291.

Magalhães, M. J., Martins, L. F., Senra, R. L., Santos, T. F. dos, Okano, D. S., Pereira, P. R. G.,

Faria-Campos, A., Campos, S. V. A., Guimarães, J. D., & Baracat-Pereira, M. C. (2016). Differential abundances of four forms of Binder of SPerm 1 in the seminal plasma of Bos taurus indicus bulls with different patterns of semen freezability. *Theriogenology*, *86*(3), 766-777.e2. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.030

Manjunath, P. (2016). *New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components*. *July*.

Manjunath, P., Lefebvre, J., Jois, P. S., Fan, J., & Wright, M. W. (2009). New Nomenclature for Mammalian BSP Genes1. *Biology of Reproduction*, *80*(3), 394–397. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074088

Manjunath, P., & Thérien, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, *53*(1–2), 109–119. https://doi.org/10.1016/S0165-0378(01)00098-5

Martins, C. F., Rumpf, R., Pereira, D. C., & Dode, M. N. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science*, *101*(3–4), 326–331. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.018

Monaco, E., Gasparrini, B., Boccia, L., De Rosa, A., Attanasio, L., Zicarelli, L., & Killian, G. (2009). Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*, *71*(3), 450–457. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.012

Moreau, R., & Manjunath, P. (2000). Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1487*(1), 24–32. https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00080-9

Moura, A. (2005). Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. *Reproducción Animal*, *2*, 5–7.

Moura, A. A., Chapman, D. A., Koc, H., & Killian, G. J. (2006). Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *Journal of Andrology*, *27*(4), 534–541. https://doi.org/10.2164/jandrol.05201

Moura, A. A., Chapman, D. A., Koc, H., & Killian, G. J. (2007). A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, *98*(3–4), 169–188. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.012

Moura, A. A., Koc, H., Chapman, D. A., & Killian, G. J. (2006). Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *Journal of Andrology*, *27*(2), 201–211. https://doi.org/10.2164/jandrol.05089

Naaby-hansen, S., Mandal, A., Wolkowicz, M. J., Sen, B., Westbrook, V. A., Shetty, J., Coonrod, S. A., Klotz, K. L., Kim, Y., Bush, L. A., Flickinger, C. J., & Herr, J. C. (2002). CABYR , a Novel Calcium-Binding Tyrosine Phosphorylation-Regulated Fibrous Sheath Protein Involved in Capacitation. *Developmental Biology*, *254*, 236–254. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0527

Nauc, V., & Manjunath, P. (2000). Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction*, *63*(4), 1058–1066. https://doi.org/10.1095/biolreprod63.4.1058

Nilsson, G., Belasco, J. G., Cohen, S. N., & von Gabain, A. (1987). Effect of premature termination of translation on mRNA stability depends on the site of ribosome release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(14), 4890–4894. https://doi.org/10.1073/pnas.84.14.4890

Ono, B., Kimiduka, H., Kubota, M., Okuno, K., & Yabuta, M. (2007). Role of the ompT mutation in stimulated decrease in colony-forming ability due to intracellular protein

aggregate formation in Escherichia coli strain BL21. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *71*(2), 504–512. https://doi.org/10.1271/bbb.60541

Pardede, B. P., Agil, M., & Supriatna, I. (2020). Protamine and other proteins in sperm and seminal plasma as molecular markers of bull fertility. *Veterinary World*, *13*(3), 556–562. https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.556-562

Parks, J. E., & Graham, J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, *38*(2), 209–222. https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F

Pini, T., Farmer, K., Druart, X., Teixeira-Gomes, A. P., Tsikis, G., Labas, V., Leahy, T., & de Graaf, S. P. (2018). Binder of Sperm Proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Cryobiology*, *82*(April), 78–87. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.04.005

Polo, J. (2018a). *Aislamiento, Purificación y Producción de Proteínas de Plasma Seminal Bovino y Evaluación de su actividad en Procedimientos de Criopreservación Espermática.* (Issue 1) [Universidad del atlantico]. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Polo, J. (2018b). *AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE PLASMA SEMINAL BOVINO Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD EN PROCEDIMIENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA* (Issue 1) [Universidad del atlantico]. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Pons-Rejraji, H., Bailey, J. L., & Leclerc, P. (2009). Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reproduction, Fertility and Development*, *21*(4), 525. https://doi.org/doi:10.1071/rd07170

Pukazhenthi, B., Pelican, K., Wildt, D., & Howard, J. (1999). Sensitivity of Domestic Cat (Felis catus) Sperm from Normospermic versus Teratospermic Donors to Cold-Induced Acrosomal Damage1. *Biology of Reproduction*, *61*(1), 135–141. https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.135

Quintero, N. I. T. L. ; L. A. B. (2018, January). Proteinas del plasma seminal y su relación con la fertilidad espermática. *Genetica Bovina*.

Rego, J. P. A., Moura, A. A., Nouwens, A. S., Mcgowan, M. R., & Boe-hansen, G. B. (2015). Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. *Animal Reproduction Science*, *160*, 126–137. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.07.015

Retnoningrum, D. S., Pramesti, H. T., Santika, P. Y., Valerius, O., Asjarie, S., & Suciati, T. (2012). Codon optimization for high level expression of human bone morphogenetic protein-2 in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, *84*(2), 188–194. https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.05.010

Ribeiro-Peres, A. et al . (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *46*(1), 31–38. doi: 10.4067/S0301-732X2014000100005.

Rodrigues, M. A. M., Souza, C. E. A., Martins, J. A. M., Rego, J. P. A., Oliveira, J. T. A., Domont, G., Nogueira, F. C. S., & Moura, A. A. (2013). Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams. *Small Ruminant Research*, *109*(2–3), 94–100. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.032

Romão, M. J., Kölln, I., Dias, J. M., Carvalho, A. L., Romero, A., Varela, P. F., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., & Calvete, J. J. (1997). Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: A bovine polypeptide of the spermadhesin family. *Journal of Molecular Biology*, *274*(4), 650–660. https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1423

Roncoletta M, Morani EDSC, Esper CR, Barnabe VH, F. P. (2006). Fertilityassociated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim. Reprod. Sci.*, *91*, 77–87.

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli :

advances and challenges. *Microbiol*, *5*(April), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172

Rueda, F. ; R. F. H. A. L. F., Garces, T., Henry, V. B., , MVZ, Ms. M. A. P., & , MVZ; Jaime A Cardozo1*, MVZ, MSc, P. (2013). Increase in post-thaw viability by adding seminal plasma proteins to Sanmartinero and Zebu sperm ¤ Incremento en la viabilidad espermática post-descongelación por la adición de proteínas del plasma. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *26*, 98–107.

Rueda, F., Cano-Garrido, O., Mamat, U., Wilke, K., Seras-Franzoso, J., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2014). Production of functional inclusion bodies in endotoxin-free Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(22), 9229–9238. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6008-9

Rueda, F., Céspedes, M. V., Conchillo-Solé, O., Sánchez-Chardi, A., Seras-Franzoso, J., Cubarsi, R., Gallardo, A., Pesarrodona, M., Ferrer-Miralles, N., Daura, X., Vázquez, E., García-Fruitós, E., Mangues, R., Unzueta, U., & Villaverde, A. (2015). Bottom-Up Instructive Quality Control in the Biofabrication of Smart Protein Materials. *Advanced Materials*, *27*(47), 7816–7822. https://doi.org/10.1002/adma.201503676

Schoenfelder, M., & Einspanier, R. (2003). *Expression of Hyaluronan Synthases and Corresponding Hyaluronan Receptors Is Differentially Regulated During Oocyte Maturation in Cattle 1*. *277*(March), 269–277. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011577

Schoneck, C., Braun, J., & Einspanier, R. (1996). Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, *45*(3), 633–642. https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00409-2

Selas Castiñeiras, T., Williams, S. G., Hitchcock, A., Cole, J. A., Smith, D. C., & Overton, T. W. (2018). Development of a generic β-lactamase screening system for improved signal peptides for periplasmic targeting of recombinant proteins in Escherichia coli. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–18. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25192-3

Shur, B. D., Ensslin, M. A., & Rodeheffer, C. (2004). *SED1 function during mammalian sperm – egg adhesion*. 477–485. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.005

Singh, B. P., Asthana, A., Basu, A., Tangirala, R., Mohan Rao, C., & Swamy, M. J. (2020). Conserved core tryptophans of FnII domains are crucial for the membranolytic and chaperone-like activities of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS Letters*, *594*(3), 509–518. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13617

Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). *Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli*. *18*(1), 936–948. https://doi.org/10.1002/pro.102

Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology*, *115*(2), 113–128. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004

Souza, C.E., A.A. Moura, E. Monaco, G. J. K. . (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. *Anim Reprod Sci.*, *105*, 72–78. https://doi.org/10.1016 / j.anireprosci.2007.11.027

Souza, C. E. A., Moura, A. A., Monaco, E., & Killian, G. J. (2008). Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science*, *105*(1–2), 72–89. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.027

Stoecklein, K. S., Ortega, M. S., Spate, L. D., Murphy, C. N., & Prather, R. S. (2021). Improved cryopreservation of in vitro produced bovine embryos using FGF2, LIF, and IGF1. *PLoS ONE*, *16*(2).

Thérien, I., Soubeyrand, S., & Manjunath, P. (1997). Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Modulate Sperm Capacitation by High-Density Lipoprotein1. *Biology of Reproduction*, *57*(5), 1080–1088. https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.1080

Tienthai, P. (2015). The porcine sperm reservoir in relation to the function of hyaluronan. *Journal of Reproduction and Development*, *61*(4), 245–250. https://doi.org/10.1262/jrd.2015-006

Velásquez, J. A. (2013). Razas criollas colombianas: eficacia reproductiva. *Contexto Ganadero*.

Vicente, I. V., & Nieves, M. D. C. (2016). La osteopontina como biomarcador de riesgo neurológico en la enfermedad carotídea. *Angiología*, *68*(6), 3–8.

Watson, P. . (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, *60–61*, 481–492. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, *7*(4), 871–891. https://doi.org/10.1071/RD9950871

Wei, R., Wong, J. P. C., & Kwok, H. F. (2017). Osteopontin - A promising biomarker for cancer therapy. *Journal of Cancer*, *8*(12), 2173–2183. https://doi.org/10.7150/jca.20480

Willforss, J., Morrell, J. M., Resjö, S., Hallap, T., Padrik, P., Siino, V., de Koning, D. J., Andreasson, E., Levander, F., & Humblot, P. (2021). Stable bull fertility protein markers in seminal plasma. *Journal of Proteomics*, *236*, 104135. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104135

Wood, T. K., & Peretti, S. W. (1991). Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on

protein synthesis in E. Coli. *Biotechnology and Bioengineering*, *38*(4), 397–412. https://doi.org/10.1002/bit.260380410

Anexos

Anexo 1. Constancia de Aprobación de la Tesis

Nota de Aprobación

El trabajo de grado titulado: "PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DEL PLASMA SEMINAL BOVINO DE INTERÉS EN PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA", presentado por el estudiante Angela Patricia Brijaldo Villamizar como requisito parcial para optar al título de Magíster Biología Molecular y Biotecnología, fue evaluado y calificado por los evaluadores

como:

Evaluador

Evaluador

Evaluador

_____

Director

_____

Codirector

Anexo 2. Secuencia de cDNA de la aSFP bovina se identifica el codón de iniciación de la traducción (nucleótido 488 a 490) y el codón de terminación de la traducción (nucleotidos 890 a 892).

1 aggagggctc ttaagaccag gcagctggga cagctgactg gtcctgcttc tgccactggt

61 gccctggaat gtgggcaagt cccttggcct ctctgggtct caggtcctct cctgtccaag

121 gtgttgtgag gcttatgcaa gtcactggag gtgaacatgc tgaagcttaa cctcagacag

181 gagggctccc aaataag**agt** tctgtgtggc cattggtcca tgtcacctat tatctaggac

241 cgcaggaaga ggagaggaag aaaagaaatt ggtcattatt tcccagggga taaaggcaca

301 gaaagtgtgt gacaaagaca cagagaaagc agcaggcagc ccgcttctcc tagagaactg

361 gggactcccg cagccctgcg gggctgggct ccaggggagg aggaggtcag gtgtcagctg

421 ctgtgtgtat atagccccag gcctccgggg ccgggctcag tgctgaggct ggtgccaggc

481 tgtgaagatg aagctgtcca gcgtcatccc ttgggccttg ctgctcagca cagccacagt

541 ggattcaatg gactggctcc cccggaatac taactgtggg ggaatcctca aagaggagtc

601 tggagtgatc gccacctatt acggaccgaa aacaaactgt gtctggacta tccagatgcc

661 accagagtac catgttaggg tgtctatcca atatctccaa ctcaactgta ataaagagtc

721 tctggagatt atagatgggc tgccaggatc tcctgtctta gggaagattt gtgaaggttc

781 actcatggat tatagatctt ctggcagtat catgactgtc aagtacatca gagagcctga

841 gcacccagct tctttctatg aagtgttata ctttcaggat ccacaagct**t ag**tgatctct

901 gctcaggcct gagtggacaa gcgttgcaaa agagaacaac attccttgaa gaccctctgg

961 aatcagctgc ccacaaggag aagcatcttc tgatcacctg ctctcagcct gtcacctcca

1021 tcctttccag cccctggtct cctaactgca gaaagattcc ttactactga gctttagatt

1081 gttgccagtc ttgtggttag ttccttctct ttatcattat aatcattttg aataatgaaa

1141 aaaaaaaaaa aaa

Anexo 3. Secuencias de cDNA de OPN bovina. En negro se encuentra señalado el codón de inicio de traducción (nucleótido 64 y 66) y el codón de terminación de la traducción (nucleotidos 898 y 900) (Kerr et al., 1991).

1 ctgctcagca tcacagggga ctggactctt ctcgccgccg cagaccaagg aaaaatcatt

61 accatgagaa ttgcagtgat ttgcttctgc ctcttgggca ttgcctccgc ccttcc**agt**t

121 aaaccgacca gttctggcag ctctgaggaa aagcagctta acaacaaata cccagatgct

181 gtagccatat ggctaaagcc tgacccatct cagaagcaga ctttcctaac accacagaat

241 tctgtgtcct ctgaggaaac tgatgacaac aaacaaaata ccctcccaag taagtccaat

301 gaaagccctg agcaaacaga cgatctagat gacgatgatg ataacagcca ggacgtcaac

361 tctaatgact ccgacgacgc tgaaaccact gatgaccctg accattccga cgagtctcac

421 cattctgatg aatctgatga agttgatttt cccactgata ttccaacaat cgcagttttc

481 actccgttta tccctacgga aagcgcaaat gatggccgag gtgatagtgt ggcttacgga

541 ctgaagtcaa gatctaagaa gttccgccga tctaacgttc agagtccaga tgccacagag

601 gaggacttca catcacacat agagagtgag gagatgcatg acgcacctaa gaagacgagt

661 cagctgactg accacagcaa ggaaaccaac agtagcgagc tttccaaaga actcacgcca

721 aaggccaagg ataagaacaa gcattccaat ctgattgaga gtcaggaaaa ttccaaactc

781 agccaagaat tccatagcct tgaagacaag ctagacctag atcataagag tgaagaagac

841 aaacacctga aaattcgtat ttctcatgaa ttagatagtg cctcttctga ggtcaattga

901 aaggagaaaa tacaatttct tactttgctt ttagtaaaac gaaaaggata cattaaagca

961 gggtgggaga caatatgaaa tgcatatttc tcagcttagt tggtgaatgt atatgtgtgt

1021 agatctggaa acagatcatg tttttgatca ttagtttaat gtgtggcttc atggtaacac

1081 ccttctaaac taaaagcttc agagtttagt ctatgttctt tccacataca aaatgcaaac

1141 catcacagca ttttaatgtt tgctaccctt ttaggaatag aaattcatgt agaagcaaac

1201 aaaatactgt tacacacttt taagaaagaa tataaaattt gatgtcacta tgatcttttg

1261 ttttttaaat **tag**tatatat tttgttgtga ttatttttc tgttgtgaat aaatctttta

1321 tcttgaatgt g

Anexo 4. Secuencia de ADNc aSFP bovina (NM_174616.3) precursor spermadhesin-1 (134 aa), tomado del repositorio de NCBI.

1 aggagggctc ttaagaccag gcagctggga cgtcagactg gtcctgcttc tgccactggt

61 gccctggaat gtgggcaagt cccttggcct ctctgggtct caggtcctct cctgtccaag

121 gtgttgtgag gcttatgcaa gtcactggag gtgaacatgc tgaagcttaa cctcagacag

181 gagggctccc aaataagagt tctgtgtggc cattggtcca tgtcacctat tatctaggac

241 cgcaggaaga ggagaggaag aaaagaaatt ggtcattatt tcccagggga taaaggcaca

301 gaaagtgtgt gacaaagaca cagagaaagc agcaggcagc ccgcttctcc tagagaactg

361 gggactcccg cagccctgcg gggctgggct ccaggggagg aggaggtcag gtgtcagctg

421 ctgtgtgtat atagccccag gcctccgggg ccgggctcag tgctgaggct ggtgccaggc

481 tgtgaagatg aagctgtcca gcgtcatccc ttgggccttg ctgctcagca cagccacagt

541 ggattcaatg gactggctcc cccggaatac taactgtggg ggaatcctca aagaggagtc

601 tggagtgatc gccacctatt acggaccgaa aacaaactgt gtctggacta tccagatgcc

661 accagagtac catgttaggg tgtctatcca atatctccaa ctcaactgta ataaagagtc

721 tctggagatt atagatgggc tgccaggatc tcctgtctta gggaagattt gtgaaggttc

781 actcatggat tatagatctt ctggcagtat catgactgtc aagtacatca gagagcctga

841 gcacccagct tctttctatg aagtgttata ctttcaggat ccacaagctt agtgatctct

901 gctcaggcct gagtggacaa gcgttgcaaa agagaacaac attccttgaa gaccctctgg

961 aatcagctgc ccacaaggag aagcatcttc tgatcacctg ctctcagcct gtcacctcca

1021 tcctttccag cccctggtct cctaactgca gaaagattcc ttactactga gctttagatt

1081 gttgccagtc ttgtggttag ttccttctct ttatcattat aatcattttg aataatgaaa

1141 aaaaaaaaaa aaacc