

Proteínas del plasma seminal y calidad espermática de toros Romosinuano y Costeño con Cuernos

Seminal plasma proteins and sperm quality of Romosinuano and Costeño con Cuernos bulls

Juan Carlos Fernández N.¹, Natalia Herrera P.¹, María Vergara A.², Lina Coronado M.², Clara Rúgeles P.², Fabian Rueda A.³, Jaime Cardozo C.³

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar mediante SDS PAGE el perfil de proteínas del plasma seminal de toros criollos Romosinuano (ROMO) y Costeño con Cuernos (CCC) y su relación con los parámetros de calidad espermática en semen fresco y descongelado. Se colectaron tres eyaculados por toro mediante electro-eyaculación de 10 reproductores ROMO y 10 CCC. En semen fresco se determinó viabilidad (VF), motilidad masal (MMF), motilidad individual rápida progresiva (MIRPF) y concentración espermática (CE). El plasma seminal (PS) se obtuvo mediante doble centrifugación. En el semen descongelado se determinó motilidad individual de rápidos progresivos (MIRPPC), progresividad (PRPC), rápidos progresivos (RPPC) y medios progresivos (MPPC), en ambos casos usando el sistema de análisis computarizado CASA. Adicionalmente se determinó la

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Área Pecuaria, Laboratorio de Reproducción Animal, Centro de Investigación Turipaná, Córdoba, Colombia

² Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Laboratorio de Andrología, Berástegui, Córdoba, Colombia

³ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá, Cundinamarca, Colombia

⁴ E-mail: jcfernandez@agrosavia.co

Recibido: 17 de agosto de 2021

Aceptado para publicación: 2 de marzo de 2022

Publicado: 27 de abril de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

viabilidad (VPC), e integridad de la membrana mediante el test hipoosmótico. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS PAGE). Los datos se analizaron mediante prueba de T de student y la presencia de proteínas por Chi cuadrado. La relación entre las proteínas y los parámetros de calidad seminal mediante la prueba de correlación de Pearson y componentes principales de regresión hacia adelante. En semen fresco se evidenciaron diferencias ($p < 0.05$) entre las dos razas para CE y MIRPF, y en semen congelado-descongelado para VPC. Se evidenciaron 10 bandas de proteína en toros ROMO y 7 en toros CCC. Las bandas de 13, 83 y 121 kDa se relacionaron positivamente y la de 15 kDa negativamente con VF de toros ROMO. Las bandas de proteínas de 21, 25, 102 y 174 se relacionaron tanto con MF y CE en toros ROMO. En conclusión, se establecieron los perfiles electroforéticos de proteínas del plasma seminal de toros ROMO y CCC. Las relaciones entre las bandas detectadas con la calidad espermática podrían explicar en parte la capacidad fecundante del espermatozoide de estas razas.

Palabras claves: calidad seminal, SDS-PAGE, bovinos criollos, proteínas, plasma seminal

ABSTRACT

The aim of this study was to determine by SDS PAGE the protein profile of the seminal plasma of Romosinuano (ROMO) and Costeño con Cuernos (CCC) bulls and their relationship with sperm quality parameters in fresh and thawed semen. Three ejaculates per bull were collected by electro-ejaculate from 10 ROMO and 10 CCC sires. Viability (VF), mass motility (MMF), individual rapid progressive motility (MIRPF) and sperm concentration (CE) were determined in fresh semen. Seminal plasma (PS) was obtained by double centrifugation. Individual motility of rapid progressives (MIRPPC), progressivity (PRPC), rapid progressives (RPPC) and medium progressive (MPPC) were determined in thawed semen, in both cases using the CASA computerized analysis system. Additionally, viability (VPC) and membrane integrity were determined by the hypoosmotic test. Proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE). The data was analyzed by Student's T test and the presence of proteins by Chi square. The relationship between proteins and seminal quality parameters using Pearson's correlation test and principal components of forward regression. In fresh semen, differences ($p < 0.05$) were found between the two breeds for CE and MIRPF, and in thawed semen for VPC. Ten protein bands were evidenced in ROMO bulls and 7 in CCC bulls. The 13, 83 and 121 kDa bands were positively related and the 15 kDa negatively with VF from ROMO bulls. Protein bands 21, 25, 102 and 174 were associated with both MF and CE in ROMO bulls. In conclusion, the electrophoretic profiles of seminal plasma proteins from Romosinuano and Costeño con Cuernos bulls were established. The relationships between the bands detected with the sperm quality could partly explain the fertilizing capacity of the sperm of these breeds.

Key words: seminal quality, SDS-PAGE, creole cattle, proteins, seminal plasma

INTRODUCCIÓN

Las razas bovinas Romosinuano (ROMO) y Costeño con Cuernos (CCC) forman parte del grupo de razas criollas colombia-

nas caracterizadas por su adaptación a las condiciones tropicales que se ubican en el Valle del Sinú, sabanas de Sucre y Bolívar. Los machos reproductores de estas razas presentan valores de viabilidad, motilidad, morfología y concentración espermática (ca-

lidad seminal) superiores a los de razas introducidas (Espitia *et al.*, 2006). La estimación de la calidad seminal puede asociarse con el potencial fértil de un animal, y se considera fundamental en procedimientos de reproducción asistida como la inseminación artificial a tiempo fijo y la fertilización *in vitro* (Januskauskas *et al.*, 2001). Sin embargo, la estimación de la calidad seminal no siempre acierta en aspectos fundamentales de la función espermática (Kastelic, 2013). En este sentido, las herramientas moleculares como la proteómica evidencian que la fertilidad del reproductor está fuertemente ligada a la presencia y/o ausencia de proteínas específicas, tanto en el plasma seminal como en la membrana espermática, que pueden convertirse en biomarcadores de la fertilidad del reproductor (Manjunath y Chadonet, 1993).

En el plasma seminal, proteínas como las BSP (*binding seminal proteins*) están envueltas en la protección de la membrana espermática, la unión del espermatozoide al oviducto, la capacitación espermática y la fecundación misma (Kumar *et al.*, 2012). Las proteínas ácidas del fluido seminal (aSFP) evidencian un efecto antioxidante (Bustamante *et al.*, 2014), mientras que las proteínas inhibidoras de metaloproteinasas (TIMPS) se relacionan con la membrana del espermatozoide y la fusión de gametos (Moura *et al.*, 2007). Las espermadhesinas se relacionan con la capacitación espermática y prevención de la poliespermia (Moura *et al.*, 2010), y la osteopontina (OPN) actúa ligando la unión espermatozoide-ovocito (Moura *et al.*, 2011).

No obstante, se desconoce el perfil electroforético de las proteínas del plasma seminal de toros criollos ROMO y CCC y su relación con la calidad seminal, de allí que el propósito de este estudio fue generar el perfil de estas proteínas en toros Romosinuano y Costeño con Cuernos mediante electroforesis (SDS PAGE) en geles de poliacrilamida, así como y establecer posibles relaciones con las variables de calidad espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Esta investigación se realizó en el Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA –, ubicado en el municipio de Cereté, departamento de Córdoba, Colombia. La zona presenta una temperatura promedio de 29.7 °C, humedad relativa promedio de 77.8% y precipitación media entre 1352 a 1646 mm/año, con distribución bimodal.

Animales

Se trabajo con 10 toros ROMO y 10 toros CCC con edades entre 3 y 6 años. Los animales permanecieron bajo las mismas condiciones nutricionales mediante un modelo de pastoreo rotacional en praderas de *Brachiaria decumbens*, suplementados con sal mineralizada y suministro de agua a voluntad.

Muestras Seminales

Se colectaron tres muestras seminales de cada animal mediante electro eyaculación, con un mes de intervalo entre las colectas. A cada eyaculado se le determinó las variables de calidad seminal convencional, viabilidad (VF), motilidad masal (MMF), motilidad individual progresiva (MIRPF) y concentración espermática (CE). La VF mediante el conteo de espermatozoides según la coloración obtenida con la tinción de eosina-nigrosina, visto al microscopio (Olympus CH-2) con objetivo de 40x. La motilidad espermática mediante estimación visual del porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo en una alícuota de 8 μ l en microscopio óptico con objetivo de 40X. La CE se determinó mediante método espectrofotométrico con ayuda del equipo Spermacue Minitube®.

Plasma Seminal y Cuantificación de Proteínas

El plasma seminal (PS) se obtuvo por doble centrifugación de 2 ml del eyaculado a 7500 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado con una membrana Millipore 6 V de 0.22 μ m. Al filtrado se adicionó fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 5 μ M (1.0 μ l/ml de PS) como agente inhibidor de serinoproteasas y se almacenó a -20 °C. La cuantificación de proteínas se hizo según Bradford (1976).

Crio preservación del Semen y Calidad Seminal Post-descongelación

La criopreservación se realizó utilizando el medio comercial para congelación (Bioxcell®, IMV Francia, proporción 1:2 diluyente) y se dejó por 10 minutos a 37 °C. Al homogenizar la muestra, se procedió a descender la temperatura en refrigeración hasta alcanzar los 5 °C en un periodo de 2.5 h. Se adicionó el diluyente faltante para completar las dosis de la pajilla (0.5 ml) quedando durante 16 h en periodo de equilibrio. Luego, las pajillas fueron empacadas y selladas utilizando el equipo IMV L'aigle France tipo MRS 1. Se procedió a disminuir la temperatura en vapores de nitrógeno líquido durante 10 min, para finalmente sumergir las pajillas en el nitrógeno líquido para alcanzar una temperatura de -196 °C.

El proceso de descongelación de las pajillas se efectuó utilizando un equipo de baño maría a 37 °C durante 4 s. Las pajillas son secadas, se corta un extremo y se deposita el contenido en un vial y se toma 3 μ l para su evaluación en el equipo Sperm Class Analyzer® CASA System v. 6.6 (Microptic). Se determinó el porcentaje de espermatozoides con motilidad individual rápida progresiva (MIRPPC), porcentaje de espermatozoides con motilidad media progresiva (MPPC), porcentaje de espermatozoides rápidos progresivos (RPPC), progresividad

(PPC) y viabilidad post congelación (VPC). Se realizó también la prueba de endosmosis (PHT) (Ramu y Jeyendran, 2013), para determinar la integridad de la membrana espermática.

Electroforesis Unidimensional (SDS-PAGE)

Para la separación unidimensional de las proteínas se tomaron 15 μ g de proteínas del plasma seminal y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El procedimiento se realizó en geles de 7 x 8 cm y de 1.0 mm de grosor, en gradiente de concentración lineal de poliacrilamida (10-20%). Las soluciones de poliacrilamida se prepararon a partir de una solución stock al 30%, en un tampón con Tris-Base 1.38 M, EDTA al 0.3% y SDS (dodecilsulfato sódico) al 0.4% en agua a pH 8.8. La polimerización se realizó con 0.8 μ l/ml de TEMED (N, N, N', N' Tetrametil-etilendiamina) y 17 μ l/ml de APS (persulfato de amonio) al 4%. Se mezcló 15 μ g de proteína total con un tampón de carga compuesto por 60% de glicerol, 5% SDS, 0,125 M Tris-HCl a pH 6.8, 5% 2-Mercaptoetanol, 10 mM EDTA y 0,1% azul bromofenol.

Para la determinación de los pesos moleculares de las bandas se usó el marcador de peso molecular «Precision plus protein estándar» (Bio-Rad®). La electroforesis se realizó a 85 v durante 180 min. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie, y se revelaron con una solución decolorante a base de metanol-ácido acético, hasta la visualización de las bandas de proteína. Finalmente, los geles se digitalizaron en un documentador (Molecular Imagen Gel Doc, Bio-Rad®) y las imágenes obtenidas se analizaron con el software Image Lab® para determinar el peso molecular y la concentración relativa de las bandas de proteínas.

Cuadro 1. Porcentajes espermáticos de viabilidad (VF), motilidad masal (MMF), motilidad individual rápida progresiva (MIRPF) y concentración espermática (CE) en semen fresco y de viabilidad (VPC) y motilidad rápida progresiva (MIRPPC) en semen congelado-descongelado de bovinos criollos Romosinuano (ROMO) y Costeño con Cuernos (CCC)

Raza	VF±DE (%)	MMF±DE (%)	MIRPF±DE (%)	CE±SD (SPZx10 ⁶ /ml)	VPC±DE (%)	MIRPPC ±DE (%)
ROMO	78.4 ± 11.3	83.6 ± 11.3	81.5 ± 11.0	1013 ± 295.8 ^a	32.8 ± 9.2 ^a	40.8 ± 15.7 ^a
CCC	82 ± 8.2	81.7 ± 9.2	81.7 ± 8.3	831.8 ± 271.3 ^b	17.2 ± 7.9 ^b	22.9 ± 7.4 ^b

^{a,b} Valores con diferentes letras en columnas indican diferencias significativas (p<0.05)

DE: desviación estándar

Análisis Estadístico

Las variaciones de motilidad y viabilidad espermática de semen fresco y congelado se analizaron mediante una prueba T-Student pareada. Se determinó el coeficiente de correlación (r^2) entre la cantidad relativa de cada banda de proteína y los parámetros de calidad seminal. Además se realizó una prueba de componentes principales y un procedimiento de regresión hacia adelante como una aproximación para determinar las bandas de proteína que pueden explicar en mayor medida el comportamiento de las variables de la calidad seminal.

RESULTADOS

Calidad seminal en semen fresco y crio preservado

En semen fresco solo se encontraron diferencias (p<0.05) en los valores de CE de las dos razas (Cuadro 1). En el semen crio preservado se evidenciaron diferencias (p<0.05) para los valores de viabilidad post-descongelación (VPC) y motilidad individual rápida progresiva post-descongelación (MIRPPC), con mayores valores para la raza ROMO (Cuadro 1).

Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de proteínas del plasma seminal

El análisis de los perfiles electroforéticos de las proteínas de plasma seminal evidenció la presencia de 10 y 7 bandas de proteínas en el plasma seminal de toros ROMO y CCC, respectivamente (Figura 1). En cuanto a la concentración relativa de las proteínas, las bandas de 13 kDa y 15 kDa fueron las de mayor valor en el plasma seminal de ambas razas (Cuadro 2).

El análisis de correlación entre las bandas de proteínas y las variables de calidad seminal solo evidenció relaciones para los toros ROMO. Las bandas de proteína de 13 y 83 kDa correlacionaron con VF (p<0.01, $r=0.53$; p<0.05, $r=0.40$ respectivamente), mientras que las bandas de 75 y 102 kDa correlacionaron con la CE (p<0.05, $r=0.55$; p<0.04, $r=0.47$ respectivamente) en semen fresco. Por su parte en semen congelado, las bandas de proteína de 68, 75, 83 y 174 kDa correlacionaron de forma negativa con MIRPPC (p<0.005, $r=-0.76$; p<0.04, $r=-0.53$; p<0.05, $r=-0.42$ y p<0.05, $r=-0.39$ respectivamente), y las bandas de 75 y 83 kDa tuvieron igualmente una relación negativa (p<0.004, $r=-0.73$; p<0.007, $r=-0.56$ respectivamente) con VPC (tabla 3).

Cuadro 2. Concentración relativa y frecuencia de presentación de las bandas de proteínas en plasma seminal de toros Romosinuano y Costeño con Cuernos

Banda de proteína (kDa)	Romosinuano		Costeño con Cuernos	
	Concentración relativa (%)	Frecuencia (n)	Concentración relativa (%)	Frecuencia (n)
174	1.48±0.56	24	3.50±1.7	26
121	0.97±0.47	20	-	-
102	1.95±1.1	20	-	-
83	3.24±1.3	21	-	-
75	2.11±1.0	13	2.14±0.9	27
68	1.56±0.7	11	2.04±0.8	23
25	5.1±2.8	12	5.53±4.2	12
21	2.55±1.7	22	5.15±1.8	23
15	46.05±23	29	51.99±13.6	30
13	34.97±11.3	20	29.61±13.7	29

El análisis de componentes principales en toros ROMO evidenció la existencia de relaciones positivas de pequeño valor entre MMF, MIRPF y CE con las bandas de proteínas de 21, 25, 102 y 174 kDa en semen fresco. Además, se evidenció una relación inversa entre estas variables y la banda de proteína de 15 kDa. Por otra parte, se evidenciaron relaciones positivas entre la variable de VF y las bandas de 13, 83 y 121 kDa, y una relación negativa con la banda de 15 kDa. Las variables de calidad seminal post-descongelación de MIRPPC, progresividad, MPPC, RPPC, VPC y PHT fueron negativas con las bandas de 13, 68, 75, 83 y 121 kDa. Asimismo, se evidenciaron relaciones menores y positivas entre estas variables de calidad seminal y las bandas de 21, 25, 102 y 174 kDa (Figura 2).

En cuanto a los toros CCC, el análisis de componentes principales evidenció en semen fresco relaciones pequeñas y directas entre MM, MIRP y CE con las bandas de proteínas de 15 y 174 kDa, y relaciones in-

versas de estas variables con la proteína de 75 kDa (Figura 3). En semen congelado se evidenciaron relaciones directas entre las variables VPC, MIRPPC, progresividad, RPPC y MPPC con las bandas de proteínas de 15 y 174 kDa, y negativas entre las variables de calidad mencionadas y la banda de 75 kDa (Figura 3).

Los datos se sometieron a un procedimiento de regresión hacia adelante para detectar interacciones de las bandas de proteínas con las variables de calidad seminal seleccionando modelos significativos mayor al 95%. El modelo en el caso del semen fresco de toros ROMO y la viabilidad espermática semen fresco integró a las bandas de 15 y 75 kDa, mientras que para viabilidad post-congelación, se integraron las bandas de 75 y 83 kDa. Para la motilidad en semen fresco se relacionaron las bandas de 15, 21, 68 y 83 kDa y en semen post-congelación las bandas de 13, 15, 68 y 75 kDa (Cuadro 4). Por su parte, en toros CCC, las bandas de 21, 25 y 75 kDa explican la motilidad en semen fres-

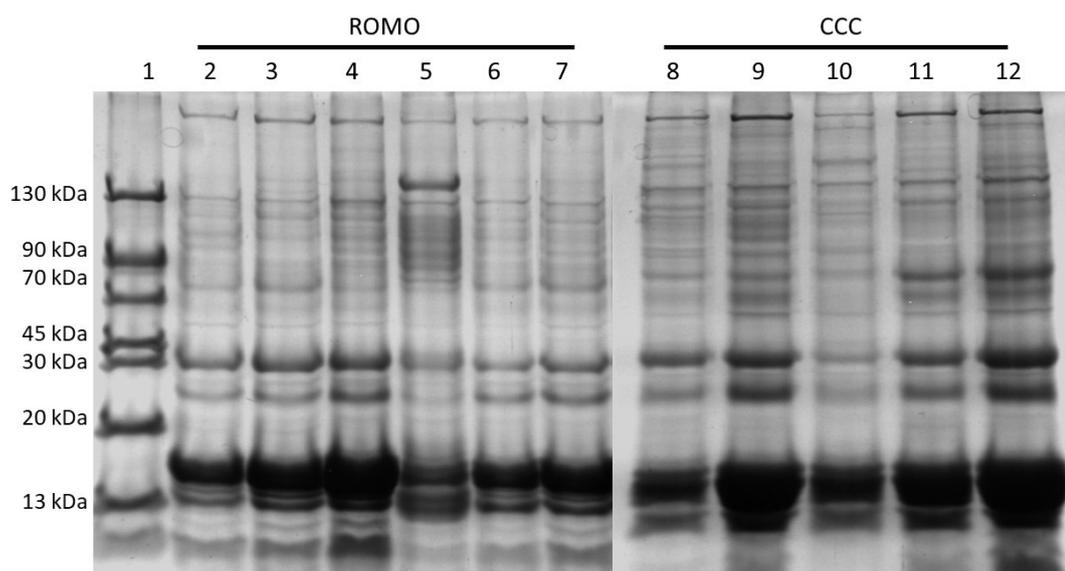


Figura 1. Perfil electroforético de las proteínas del plasma seminal de toros ROMO (líneas 2-7); y CCC (líneas 8-12). Marcador de peso molecular en la línea 1.

Cuadro 3. Correlaciones entre las bandas de proteínas y las variables viabilidad (VF) y concentración espermática (CE) en semen fresco, y motilidad individual rápida progresiva (MIRPPC) y viabilidad espermática en semen congelado-descongelado (VPC) de toros Romosinuano

Bandas de proteínas (kDa)	Semen fresco		Semen congelado-descongelado	
	VF (%)	CE (SPZx10 ⁶ /ml)	MIRPPC %	VPC %
174			(r = -0.39*)	
102		(r = 0.47*)		
83	(r = 0.40*)		(r = -0.42*)	(r = -0.56**)
75		(r = 0.55*)	(r = -0.53*)	(r = -0.73***)
68			(r = -0.76***)	
13	(r = 0.53**)			

*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.005

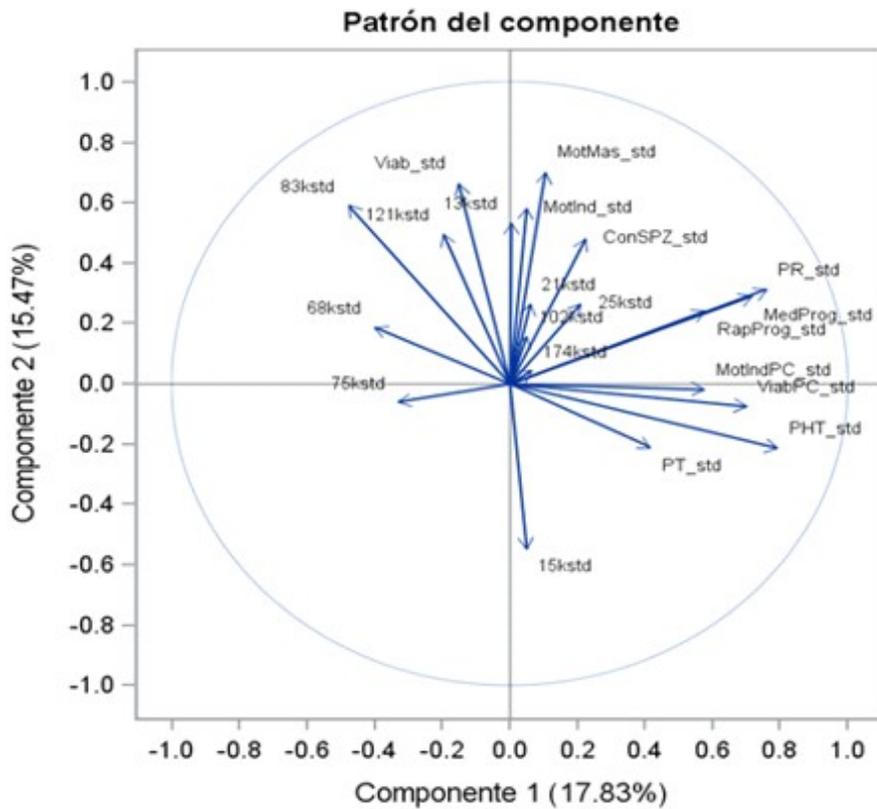


Figura 2. Análisis de componentes principales. Se evidencian las relaciones entre las variables de calidad seminal de semen fresco y pos-descongelado con las bandas de proteína en toros Romosinuano

co, mientras que en semen post-congelación solo se explica por la banda de 75 kDa (Cuadro 4). Vale indicar que solo se seleccionaron modelos significativos mayor al 95%.

DISCUSIÓN

La CE en semen fresco fue mayor en toros ROMO, sugiriendo una mayor capacidad fecundante a la de los toros CCC. En este sentido, se han reportado diferencias en la CE entre grupos raciales (Novianti *et al.*, 2020), y ciertamente entre animales del mismo grupo racial (Assumpcao *et al.*, 2013).

La CE en toros ROMO fue similar al reportado por Palmieri *et al.* (2004).

Se obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides viables y móviles en semen congelado-descongelado en toros ROMO que en toros CCC. Esta respuesta podría estar asociada con la presencia de moléculas específicas del plasma seminal que protegerían la membrana espermática del estrés térmico y oxidativo ocasionado por la congelación. (Pini *et al.*, 2018).

Es de resaltar que las bandas de proteínas de 13 y 15 kDa son las de mayor concentración relativa en el plasma seminal de

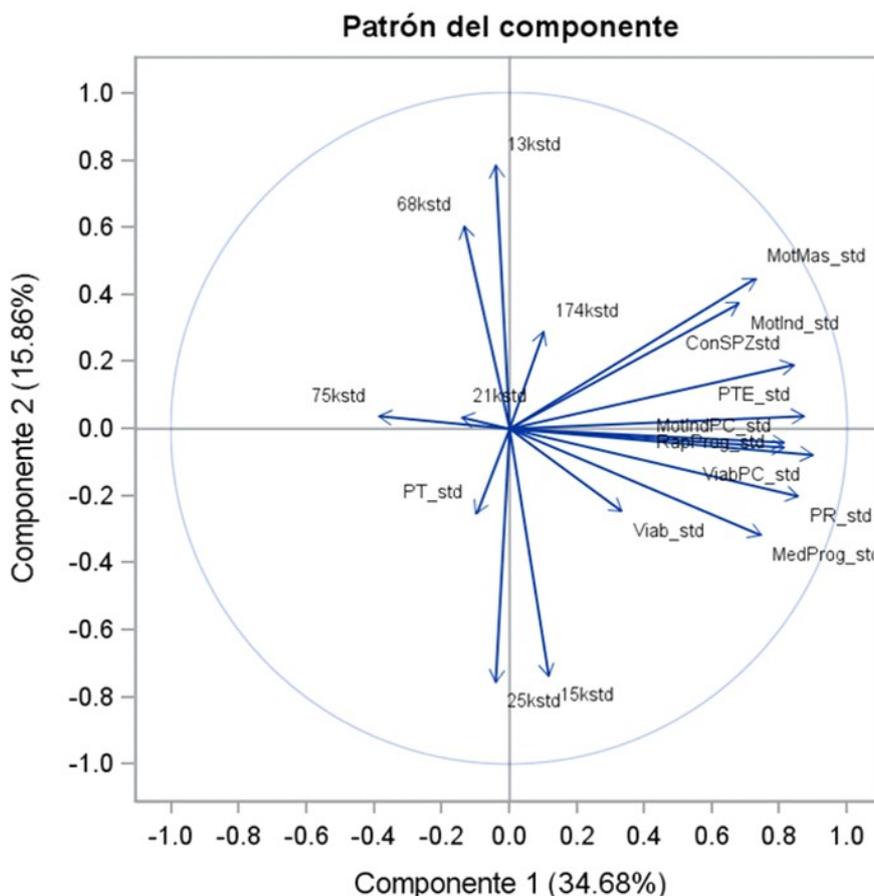


Figura 3. Análisis de componentes principales. Se evidencian las relaciones entre las variables de calidad seminal de semen fresco y pos-descongelado con las bandas de proteína en toros Costeño con Cuernos

ambas razas, y posiblemente en ellas se encuentren las proteínas pertenecientes a la familia de las BSP (Sarsaifi *et al.*, 2015). Más específicamente, la banda de proteína de 15 kDa podría corresponder a la BSPA1/A2 (Abou y Tulsiani, 2009), mientras que la banda de 13 kDa podría ser la BSP A3 (Moura *et al.*, 2007; Mungai *et al.*, 2011).

Un hallazgo interesante es la presencia exclusiva de las bandas de proteína de 83 kDa, 102 kDa y 121 kDa en el PS de toros ROMO. La banda de 83 kDa podría corresponder a la gelsolina (Belleannée *et al.*, 2011) que pro-

tege a las células de efectos tóxicos (Jobim *et al.*, 2004) y regula la motilidad y viabilidad del espermatozoide (Ickowicz *et al.*, 2012). En tanto, la banda de 102 kDa, podría ser el péptido beta-manosidasa (Kelly *et al.*, 2006), la cual se le relaciona con la interacción de espermatozoide-oocito (Belleannée *et al.*, 2011) y con la implantación y desarrollo inicial del embrión (Venditti *et al.*, 2010). La presencia de esta banda de proteína en el PS de toros ROMO podría influenciar las mayores tasas de fecundación reportadas en estos toros raza con respecto a los CCC.

Cuadro 4. Ecuaciones de los modelos construidos a partir de la cantidad relativa de cada banda. Ecuaciones a través de regresión hacia adelante como aproximación para explicar las variables de calidad seminal de toros Romosinuano y Costeños con Cuernos.

Raza	Variable	Ecuación del modelo	r^2	Pr>F modelo
Romosinuano	VF	$75.55 - 0.07*[15 \text{ kDa}] + 2.39*[75 \text{ kDa}] + 1.54*[83 \text{ kDa}]$	0.23	0.042
	VPC	$39.87 - 1.79*[75 \text{ kDa}] - 1.83*[83 \text{ kDa}]$	0.27	0.013
	MIRPF	$67.29 - 0.25*[15 \text{ kDa}] - 2.78*[21 \text{ kDa}] - 2.47*[68 \text{ kDa}] - 2.98*[83 \text{ kDa}]$	0.36	0.017
	MIRPPC	$4.11 + 0.39*[13 \text{ kDa}] + 0.23+[15 \text{ kDa}] - 4.96*[68 \text{ kDa}] - 2.87*[75 \text{ kDa}]$	0.46	0.002
Costeño con Cuernos	MIRP	$103 - 2.51*[21 \text{ kDa}] - 2.14*[25 \text{ kDa}] - 4.02*[75 \text{ kDa}]$	0.30	0.023
	MMF	$110.2 - 2.74*[21 \text{ kDa}] - 2.76*[25 \text{ kDa}] - 6.17*[75 \text{ kDa}]$	0.45	0.001
	MIRPPC	$33-58 - 5.48*[75 \text{ kDa}]$	0.13	0.046

Viabilidad espermática en semen fresco (VF), viabilidad espermática en semen descongelado (VPC), motilidad individual rápida progresiva en semen fresco (MIRPF), motilidad individual rápida progresiva en semen post descongelación (MIRPPC), motilidad individual rápida progresiva en semen y motilidad masal en semen fresco (MMF)

Los análisis mostraron mayor número de bandas de proteínas relacionadas con los parámetros de calidad espermática en toros ROMO. El análisis de correlación general solo evidenció correlaciones en semen fresco y descongelado de toros ROMO. En semen fresco se evidenció relación positiva entre la VF y las proteínas de 13 y 83 kDa. La banda de 13 kDa posiblemente corresponda a la BSP A3 que ha sido reportada con este peso molecular, y que se caracteriza por tener un potencial electrostático negativo (Mungai *et al.*, 2011), lo cual le permite preservar su integridad. Kumar *et al.* (2012) y Muhammad *et al.* (2014) la han asociado con fertilidad de toros tipo carne.

La correlación positiva de la banda de 83 kDa (posible gelsolina) podría deberse a que en semen fresco esta proteína no provo-

ca despolimerización de la actina, al encontrarse unida a fosfoinosítidos, con lo cual la actina se mantendría polimerizada (Ickowicz *et al.*, 2012), lo que podría contribuir con la integridad de la membrana espermática.

Se encontró correlación positiva entre la CE y las proteínas de 75 y 102 kDa en semen fresco de toros ROMO. Aunque no se ha reportado investigaciones que asocien estas proteínas con la CE, la proteína de 75 kDa podría ser la clusterina, que actúa como chaperona al solubilizar péptidos parcialmente desnaturalizados por efectos del estrés celular, por lo que reduciría los efectos tóxicos de proteínas desnaturalizadas sobre los espermatozoides (Mascarenhas *et al.*, 2009), manteniendo la CE en niveles deseables. Por otro lado, no se tienen reportes que señalen relación alguna de la banda de 102 kDa (posible β -manosidasa) con la CE.

Cuando los datos se analizaron por componentes principales, la VF se vio influenciada de manera positiva por las bandas de 13, 83 y 121 kDa y negativa por la banda de 15 kDa. No se conoce el papel de la banda de 121 kDa en el funcionamiento del espermatozoide, pero esta relación sugiere que puede actuar como protectora de la membrana del espermatozoide. Por otro lado, la acción de la banda de 15 kDa sería de provocar la salida de colesterol de la membrana espermática, conduciendo a su desestabilización y a la capacitación espermática.

El análisis de componentes principales evidenció relaciones positivas con las proteínas de 21, 25 y 174 kDa, y negativa con la banda de 15 kDa. La banda de 21 kDa puede ser aquella identificada por Mungai *et al.* (2007) en toros Limousin con peso molecular de 20 kDa, que fue asociada con la recuperación de la permeabilidad de la membrana espermática del espermatozoide sometido a choque térmico. De la misma forma, Barrios *et al.* (2000) reportaron una proteína de 20 kDa en PS de ovinos, que sería responsable de la restauración de la membrana del espermatozoide sometido a procesos de estrés térmico por frío. Por otro lado, la banda de 25 kDa podría tratarse de TIMP-2 (Moura *et al.*, 2007), parte de la familia de las proteínas inhibitoras de las metaloproteinasas, las cuales se relacionan con la membrana y la fusión de los gametos. En tanto, la banda de 174 kDa podría tratarse de la reportada en PS de toros Simmental (Baharun *et al.*, 2021), con peso molecular entre 156 y 180 kDa, que se relacionó con la fertilidad del animal y que basado en su peso molecular se trataría de la proteína reguladora del complemento C3 (180 kDa). Estas proteínas son posiblemente importantes en la interacción del plasma seminal con la respuesta inmunológica del tracto femenino (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

El análisis de componentes principales para las variables de motilidad (MMF y MIRPF) en semen fresco mostró que son influenciadas por las mismas bandas de proteínas y con igual comportamiento que las que

influyen en la CE en semen fresco. Es interesante la relación negativa entre MIRPF y la proteína de 15 kDa, en caso se trate de la BSP A1/A2, ya que esta proteína se ha asociado con la motilidad espermática (Abou *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2013). Como se sabe, las BSP, además de participar en la capacitación del espermatozoide, evidencian habilidad para prolongar la sobrevivencia y la motilidad del espermatozoide en el oviducto (Gwathmey *et al.*, 2006).

El análisis de correlación evidenció en semen crio preservado que relaciones negativas entre las proteínas y VPC y MIRPPC. Las proteínas de 75 y 83 kDa correlacionaron con VPC, mientras que MIRPPC con las bandas de 68, 75, 83 y 174 kDa. La banda de 75 kDa puede ser la clusterina, la cual aglutina espermatozoides anormales (Ollero *et al.*, 1998), y que en este caso podría estar ejerciendo su acción sobre los espermatozoides afectados por la crio preservación, disminuyendo los porcentajes de espermatozoides motiles y viables (Ibrahim, 1999). Con respecto a la banda de 83 kDa (posible gelsolina), Azamar *et al.* (2007) demostraron que puede inhibir drásticamente la motilidad individual de los espermatozoides de cobayos, aunque la acción depende de su concentración (Belleannée *et al.*, 2011). Los papeles expuestos para esta proteína explicarían la relación negativa encontrada con la VPC y la MIRPPC en esta investigación. Con respecto a la banda de 68 kDa (posible albúmina por su peso molecular) y 174 kDa no se han reportado relaciones con la motilidad, pero el resultado sugiere que esté actuando como un factor de anti-motilidad.

El análisis de componentes principales para semen pos-descongelado en ROMO involucró 9 de las 10 proteínas que de una u otra forma se han relacionado con los parámetros de calidad seminal. Las proteínas de 13, 68, 75, 83 y 121 kDa se relacionaron negativamente con VPC, PHT, MIRPPC, Progresividad, MPPC, RPPC, mientras que las de 21, 25, 102 y 174 lo hicieron positivamente. En cuanto a MIRPPC persisten las

relaciones negativas con las proteínas de 68, 75 y 83 kDa encontradas en el análisis de correlación general, y se suman además las proteínas de 13 y 121 kDa.

Para VPC y PHT, el análisis corroboró la relación negativa con las proteínas de 75 y 83 kDa en el procedimiento de correlación general. De otra parte, la BSP A3 (posiblemente la banda de 13 kDa) posiblemente incrementa los sitios de unión en la membrana del espermatozoide para las BSP por pérdida de proteínas en la membrana espermática (Ollero *et al.*, 1998), los cuales quedan disponibles para interactuar con el espermatozoide (Ardon y Suarez, 2013). Estos planteamientos pueden explicar la relación negativa de la banda de 13 kDa con la VCP y PHT en este estudio.

Un aspecto interesante lo constituye las relaciones positivas entre la VPC y PHT y las proteínas de 21, 25, 102 y 174 kDa. La proteína de 21 kDa puede corresponder con aquella ligada a la recuperación de la permeabilidad de la membrana espermática que ha sido sometida a choque térmico (Mungai y Machado, 2007). Por otra parte, la proteína de 25 kDa (posible TIMP2), influye sobre la viabilidad del espermatozoide mediante la inhibición de la actividad de las metaloproteinasas (McCauley *et al.*, 2001) y la de 102 kDa (posible beta-manosidasa) se ha relacionado con la modulación de la adhesión célula-célula (Belleannée *et al.*, 2011), por lo cual su papel puede estar indirectamente relacionado con el mantenimiento de la viabilidad del espermatozoide.

El análisis por componentes principales en toros CCC evidenció el mismo patrón de relacionamiento de las proteínas tanto en semen fresco como pos-descongelado con los parámetros de calidad seminal involucrados. Las proteínas de 15 kDa y 174 kDa se relacionaron positivamente con MM, MIRP y CE en semen fresco, mientras que la de 75 kDa se relacionó negativamente. Igual relación se vio entre estas proteínas y los parámetros

VPC, MIRPPC, PPC, RPPC y MPPC. Como se ha dicho, uno de los papeles de la proteína de 15 kDa (posible BSPA1/A2) está relacionado con la motilidad espermática (Espitia *et al.*, 2006). En cuanto a la CE no se conoce relación con las proteínas de 15 y 174 kDa, mientras que la banda de 75 (posible clusterina) ha sido relacionada negativamente con motilidad espermática (Ibrahim, 1999), lo cual explicaría lo encontrado en semen fresco. En semen congelado de toros CCC, el análisis de componentes principales infiere que las proteínas de 15 kDa y 174 kDa podrían ayudarles a mantener la motilidad de los espermatozoides en condiciones de crio preservación, mientras que la relación positiva con VPC sugiere un efecto protector de la membrana espermática por parte de esta proteína en condiciones de estrés por crio preservación.

Existen asociación entre proteínas cuya relación depende el funcionamiento del espermatozoide de las razas criollas involucradas en este estudio. Igualmente se aprecia que ante aspectos estresantes como la crio preservación, un mayor número de ellas intervienen e inciden en el proceso reproductivo. Así mismo proteínas como las de 20, 75, 83, 102 y 174 kDa, tienen efectos sobre varios parámetros de calidad espermática tanto en semen fresco como crio preservado, lo que sugiere que juegan un papel de gran importancia, y que forman parte importante dentro un conjunto de proteínas que aseguran el adecuado funcionamiento del espermatozoide.

Respecto al análisis de regresión en toros ROMO, los modelos indicaron la existencia de cuatro proteínas (bandas de 15, 68, 75 y 83 kDa) que se repiten en al menos tres de los modelos seleccionados ($p < 0.05$). Por otra parte, en toros CCC se evidenció la existencia de tres proteínas (21, 25 y 75 kDa) que se repiten en los modelos seleccionados ($p < 0.05$). Asimismo, llama la atención que en los tres análisis realizados en semen de toros ROMO, tanto en semen fresco como crio

preservado, las bandas de 75 y 83 kDa participan o se relacionan con el comportamiento de varios parámetros de calidad espermática, mientras que la banda de 75 kDa en toros CCC es la que denota una mayor participación o relación con el comportamiento de los parámetros de calidad seminal.

CONCLUSIONES

- El estudio describió por primera vez las diferencias en el perfil electroforético de las proteínas del plasma seminal de toros Romosinuano y Costeño con Cuernos.
- Tres proteínas de alto peso molecular se evidenciaron exclusivamente en toros Romosinuano.
- Un mayor número de proteínas se relacionaron con variables de calidad seminal en toros Romosinuano, tanto en semen fresco, como en semen pos-descongelado que en toros Costeño con Cuernos.
- La banda de 75 kDa se presenta en ambas razas y tiene relación con las variables de calidad seminal en semen fresco y pos-descongelado.

Agradecimientos

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) por la financiación de los recursos para el desarrollo del proyecto de conservación de la colección biológica de las razas bovinas Romosinuano y Costeño con Cuernos del banco de germoplasma animal del C.I Turipaná.

LITERATURA CITADA

1. **Abou-haila A, Tulsiani DR. 2009.** Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* 485: 72-81. doi: 10.1016/j.abb.2009.02.003
2. **Ardon F, Suarez SS. 2013.** Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. *Reproduction* 146: 111-117. doi: 10.1530/REP-12-0468
3. **Aslam MK, Kumaresan A, Sharma VK, Tajmul M, Chhillar S, Chakravarty AK, Manimaran A, et al. 2014.** Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology* 82: 1254-1262. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.08.007
4. **Assumpcao T, Yoneyama K, Pallaoro R, Kitigawa C, Alberton C. 2013.** Perfil de proteínas e açúcares do plasma seminal e sua relação com os parâmetros andrológicos de touros da raça Nelore. *Biosci J* 29: 940-945.
5. **Azamar Y, Uribe S, Mújica A. 2007.** F-actin involvement in guinea pig sperm motility. *Mol Reprod Dev* 74: 312-320. doi: 10.1002/mrd.20578
6. **Baharun A, Arifiantini RI, Karja NWK, Said S. 2021.** Seminal plasma protein profile based on molecular weight and their correlation with semen quality of Simmental bull. *J Indones Trop Anim Agric* 46: 20-28. doi: 10.14710/jitaa.46.1.20-28
7. **Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2000.** Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 63: 1531-1537. doi: 10.1095/biolreprod63.5.1531
8. **Belleannée C, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Gatti JL, Dacheux JL, Dacheux F. 2011.** Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J Proteomics* 74: 59-78. doi: 10.1016/j.jprot.2010.07.013
9. **Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999

10. **Bustamante L, Salton G, Munari F, Ssheider M, Mattos R, Laurino J, Cirne E, et al. 2014.** Recombinant expression and purification of the bovine acidic seminal fluid protein. *Anim Reprod* 11: 96-103.
11. **Espitia A, Prieto E, Cardozo J. 2006.** Pubertad y circunferencia escrotal en toros Holstein x cebú, cebú y Romosinuano. *Rev MVZ Córdoba* 11: 744-750
12. **Gwathmey T, Ignatz G, Mueller J, Manjunath P, Suarez S. 2006.** Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 75: 501-507.
13. **Ibrahim NM, Troedsson MH, Foster DN, Loseth KJ, Farris JA, Blaschuk O, Crabo BG 1999.** Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. *J Androl* 20: 230-240.
14. **Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. 2012.** Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* 14: 816-821. doi: 10.1038/aja.2012.81
15. **Januskauska A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2001.** Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 55: 947-981. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00456-3
16. **Jobim MI, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC. 2004.** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 61: 255-266. doi: 10.1016/s0093-691x(03)00230-9
17. **Kastelic JP. 2013.** Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. *Animal Frontiers* 3: 20-25. doi: 10.2527/af.2013-0029
18. **Kelly VC, Kuy S, Palmer DJ, Xu Z, Davis SR, Cooper GJ. 2006.** Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics* 6: 5826-5833. doi: 10.1002/pmic.200500830
19. **Kumar P, Kumar D, Singh I, Yadav P. 2012.** Seminal plasma proteome: promising biomarkers for bull fertility. *Agric Res* 1: 78-86.
20. **Laemmli U. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
21. **Manjunath P, Chadonet E. 1993.** Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 49: 27-37. doi: 10.1095/biolreprod50.1.27
22. **Mascarenhas M, Macedo R, Costa R. 2009.** Marcadores proteicos de fertilidade no plasma seminal en la membrana plasmática. *Rev Bras Reprod Anim Supl* 6: 11-19.
23. **McCauley TC, Zhang HM, Bellin ME, Ax RL. 2001.** Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Mol Reprod Dev* 58: 336-341. doi: 10.1002/1098-2795(200103)-58:3<336::AID-MRD12>3.0.CO;2-Z
24. **Moura A, Andrade C, Souza C, Régo J, Martins J, Oliviera R, Menezes E. 2011.** Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim* 35: 139-144
25. **Moura A, Chapman D, Killian A. 2007.** A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci* 98: 169-188. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.03.012
26. **Moura A, Souza C, Stanley B, Chapman D, Killian G 2010.** Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J Proteomics* 73: 2006-2020. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.005.

27. **Mungai M, Machado N. 2007.** Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. *Vet Not* 13: 47-53.
28. **Mungai M, Novoa A, Machado L. 2011.** Influência das estações seca e chuvosa no plasma seminal (SDSPAGE) e características do ejaculado de touros *Bos taurus indicus*. *Semin-Cienc Agrar* 32: 1565-1574. doi: 10.5433/1679-0359.2011v32n4p1565
29. **Novianti I, Purwantara B, Herwijanti E, Nugraha CD, Putri RF, Furqon A, et al. 2020.** Effect of breeds on semen characteristics of aged bulls in the Indonesian National Artificial Insemination Center. *Indonesian J Anim Sci* 30: 173-179. doi: 10.21776/ub.jiip.2020.-030.02.10
30. **Ollero M, Bescós O, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 1998.** Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 49: 547-555. doi: 10.1016/S0093-691X(98)-00006-5
31. **Palmieri R, Suarez D, Espitia A, González M, Prieto E. 2004.** Variables seminales en toros criollos colombianos Costeño Con Cuernos y Romosinuano. *Rev MVZ Córdoba* 9: 381-385.
32. **Pini T, Farmer K, Druart X, Teixeira-Gomes AP, Tsikis G, Labas V, Leahy T, et al. 2018.** Binder of sperm proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Cryobiology* 82: 78-87. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.04.005
33. **Ramu S, Jeyendran R. 2013.** The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. In: *Methods in molecular biology*. Springer. p 21-25.
34. **Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. 2011.** Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 66(Suppl 1): 11-22. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x
35. **Sarsaifi K, Vejayan J, Wahid A, Yusoff R, Hani H, Rasoli M, Ariff M, Mazni A. 2015.** Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls. *Livest Sci* 172: 96-105. doi: 10.1016/j.livsci.2014.12.004
36. **Srivastava N, Jerome A, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A. 2013.** Bovine seminal PDC-109 protein: an overview of biochemical and functional properties. *Anim Reprod Sci* 138: 1-13. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.008
37. **Venditti J, Swann J, Bean B. 2010.** Hamster sperm-associated alpha-L-fucosidase functions during fertilization. *Biol Reprod* 82: 572-579. doi: 10.1095/biolreprod.109.076695