

**"Mejoramiento cualitativo de espermatozoides ovinos criopreservados a partir de la utilización de moléculas diferenciales del plasma seminal obtenidas por dos métodos de colecta seminal: electroeyaculador y vagina artificial"**

**Alba Ledesma**

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título de  
**DOCTOR en CIENCIAS AGRARIAS**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS**  
**Área Reproducción**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

**Balcarce, Argentina**  
**Marzo de 2018**

**"Mejoramiento cualitativo de espermatozoides ovinos criopreservados a partir de la utilización de moléculas diferenciales del plasma seminal obtenidas por dos métodos de colecta seminal: electroeyaculador y vagina artificial"**

**Alba Ledesma**

.....

Dra., Lic. en Ciencias Biológicas, Andreina Cesari  
Directora de tesis

.....

Dr., Méd. Veterinario, Federico Hozbor  
Co-Director de tesis

**"Mejoramiento cualitativo de espermatozoides ovinos criopreservados a partir de la utilización de moléculas diferenciales del plasma seminal obtenidas por dos métodos de colecta seminal: electroeyaculador y vagina artificial"**

**Alba Ledesma**

**Aprobada por:**

.....  
**Dra., Med. Vet., Ana Josefa Soler Valls**  
**Evaluadora**

.....  
**Dr., Méd. Vet., Humberto Cisale**  
**Evaluador**

.....  
**Dr., Méd. Vet., Jorge Gil**  
**Evaluador**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a Federico Hozbor quien me proporcionó libertad total para trabajar y divagar sobre el “bendito” plasma seminal y por su apoyo para realizar todas las experiencias de investigación fuera del laboratorio de reproducción del INTA Balcarce, pero fundamentalmente por su amistad.

A todas las personas que forman el grupo de reproducción, además de que todos en algún momento me ayudaron en esta tesis metodológicamente o para discutir algún resultado, con su buena onda hicieron que disfrute mucho de esta etapa.

A Andreina Cesari, mi directora, por la confianza e independencia que me dio para trabajar, por su motivación y curiosidad que logra transmitir no sólo en mí sino en todo su equipo de trabajo. También le agradezco por nunca hacerme sentir una tesista sino un par y por el buen equipo que formamos junto a Lucía Zalazar, a quien le agradezco su ayuda en muchos de los experimentos, sus buenos aportes y por las discusiones de las publicaciones con las que casi la vuelvo loca, aunque nunca perdió la paciencia.

A mi mamá Silvia “mi mayor sponsor”, a Sole y Edu por su amor y apoyo incondicional.

A Liliana Iriarte y Marita Cocimano por siempre estar dispuestas a ayudarme y por su buena onda.

Al Dr. Felipe Martínez-Pastor por darme la oportunidad de tener una de las mejores experiencias de mi vida que fue ir a trabajar a su laboratorio, en la Universidad de León, España. Porque aprendí muchísimo y me permitió desarrollar todos los resultados del capítulo III de esta tesis. Además de la experiencia me llevé una amiga, Estela Fernández-Alegre porque como ella decía *“si te llevas un amigo en León es para toda la vida”*.

A la gente del laboratorio 1-2 del Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB) por ayudarme con muchos protocolos, preparación de soluciones y a encontrar las cosas en el laboratorio!!

Amis amigas de INTA Lau, Sonia, Yani, Mai, Beti quienes están en el mismo camino de la ciencia y festejan conmigo las becas, papers y congresos, además de las charlas con mate de por medio en algún ratito de descanso laboral.

A Mer por hacerme bien y estar siempre. Gracias.

A Adriana Cano por su grandísima ayuda con los análisis estadísticos.

A los integrantes del jurado evaluador, por sus comentarios y aportes. Fue un orgullo que tres investigadores que admiro prestaran atención a mi trabajo.

También quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Mar del Plata y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET) que me financiaron durante el doctorado.

**INDICE**

<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVII</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
1.1. Anatomía y fisiología del espermatozoide de mamífero	2
1.1.1. Composición de las membranas espermáticas	4
1.2. Capacitación espermática	7
1.3. Hiperactivación espermática	8
1.4. Reacción acrosomal	9
1.5. Mecanismo general de la fertilización	10
1.6. Inseminación artificial	10
1.7. Congelación de semen: características generales	11
1.7.1. Efecto del descenso térmico sobre las estructuras celulares	12
1.8. Plasma seminal	18
Hipótesis de trabajo	23
<b>CAPÍTULO II. ....</b>	<b>24</b>
<b>INFLUENCIA DEL MÉTODO DE COLECTA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y LA RESPUESTA DE LOS ESPERMATOZOIDES A LA CRIOPRESERVACIÓN .....</b>	<b>24</b>
2.1. INTRODUCCIÓN	25
2.2. MATERIALES y MÉTODOS	31
2.2.1. Lugar y período experimental	31
2.2.2. Obtención y procesamiento de los eyaculados	31
2.2.3. Congelación y descongelación de semen	33
2.2.4. Evaluaciones cuali-cuantitativas realizadas sobre los espermatozoides	34
2.2.5. Determinaciones realizadas en el plasma seminal	38
2.2.6. Análisis estadístico de los datos	41
2.3. RESULTADOS	42
2.3.1. Evaluaciones cuali-cuantitativas realizadas sobre los eyaculados en estado fresco y luego de la congelación/descongelación	42
2.3.2. Evaluaciones realizadas sobre el plasma seminal	43
2.4. DISCUSIÓN	47

<b>CAPACIDAD DE LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL QUE INTERACTÚAN CON LOS ESPERMATOZOIDES DE REVERTIR LOS DAÑOS OCASIONADOS POR LA CRIOPRESERVACIÓN .....</b>	<b>51</b>
3.1. INTRODUCCIÓN	52
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.2.1. Lugar y período experimental	55
3.2.2. Organización del trabajo	55
3.2.3. Obtención de eyaculados	56
3.2.4. Obtención de plasma seminal y proteínas	56
3.2.5. Detección de RSVP14 y RSVP20 por western blot	57
3.2.6. Diseño Experimental	58
3.2.7. Análisis de parámetros espermáticos	60
3.2.8. Análisis estadístico de los datos	64
3.3. RESULTADOS	66
3.3.1. Optimización de la metodología para obtener proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides (PPSiE)	66
3.3.2. Efecto de las proteínas del plasma seminal que interactúan con la superficie espermática (PPSiE) sobre la movilidad espermática en función del tiempo de incubación	67
3.3.3. Efecto de las proteínas del plasma seminal que interactúan con la superficie espermática (PPSiE) sobre parámetros espermáticos a tiempo fijo	70
3.3.4. Análisis de las subpoblaciones espermáticas	74
3.4. DISCUSIÓN	79
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>87</b>
<b>PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE UN PÉPTIDO CON DOMINIOS DE FIBRONECTINA Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE LOS DAÑOS OCASIONADOS POR LA CRIOPRESERVACIÓN .....</b>	<b>87</b>
4.1. INTRODUCCIÓN	88
4.2. MATERIALES y MÉTODOS	92
4.2.1. Lugar y período experimental	92
4.2.2. Producción de la proteína recombinante	92
4.2.3. Marcado de TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> con FITC y unión a los espermatozoides	97
4.2.4. Evaluación del efecto de TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> sobre parámetros de calidad seminal	98
4.2.5. Análisis estadístico de los datos	101
4.3. RESULTADOS	103
4.3.1. Producción de la proteína recombinante	103
4.3.2. Marcado de la proteína con FITC y unión a los espermatozoides	107
4.3.3. Efecto de TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> sobre la calidad seminal	108
4.4. DISCUSIÓN	113
<b>6. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>119</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>122</b>

**7. ANEXO..... 142**

## INDICE DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1.** Estructura de un espermatozoide de mamífero..... 4  
**Figura 2.** Representación esquemática del espermatozoide y sus dominios..... 7

### Capítulo II

- Figura 3.** Vagina artificial utilizada para las colectas seminales. .... 26  
**Figura 4.** Electroeyaculador utilizado para las colectas seminales.. .... 27  
**Figura 5.** Esquema del diseño experimental adoptado para la colecta de semen y de plasma seminal para su posterior análisis y criopreservación. .... 34  
**Figura 6.** Espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina, representando integridad de la membrana plasmática..... 36  
**Figura 7.** Espermatozoides sometidos a la prueba HOS, representando funcionalidad de la membrana plasmática. .... 37  
**Figura 8.** Espermatozoides expuestos a la prueba de la clortetraciclina, representando el estado de capacitación. .... 38  
**Figura 9.** Análisis electroforético en una dimensión de las proteínas que componen el plasma seminal obtenido por electroeyaculador (EE) y vagina artificial (VA) ..... 45  
**Figura 10.** Análisis electroforético en dos dimensiones de las proteínas de bajo peso molecular que componen el plasma seminal obtenido por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA)... ..... 46

### Capítulo III

- Figura 11.** Parámetros de velocidad espermática ..... 61  
**Figura 12.** Inmunodetección de proteínas RSVP14 y RSVP20 en PPSiE obtenidas con VA: vagina artificial y EE: electroeyaculación..... 67  
**Figura 13.** Evaluación del patrón de proteínas fosforiladas en residuos tirosina en espermatozoides congelados/descongelados..... 72  
**Figura 14.** Esquema representativo de un citograma para espermatozoides teñidos con diferentes combinaciones de fluorocromos para evaluar parámetros fisiológicos celulares.. ..... 74

<b>Figura 15.</b> Distribución de subpoblaciones espermáticas en semen criopreservado de carneros de alta y baja fertilidad .....	77
<b>Figura 16.</b> Distribución de las subpoblaciones espermáticas entre tratamientos .....	78

#### Capítulo IV

<b>Figura 17.</b> Esquema del vector pET-32 Ek/LIC .....	93
<b>Figura 18.</b> Fecundación <i>in vitro</i> heteróloga positiva .....	101
<b>Figura 19.</b> Análisis electroforético de los productos de la reacción de PCR realizada sobre la biblioteca de ADNc de epidídimo bovino. ....	103
<b>Figura 20.</b> Análisis electroforético de los productos de digestión del inserto y del vector .....	104
<b>Figura 21.</b> Análisis electroforético de los productos de la reacción de Colony PCR..	105
<b>Figura 22.</b> Sobreexpresión de la proteína recombinante TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> . ....	106
<b>Figura 23.</b> Purificación de la proteína recombinante TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> .....	107
<b>Figura 24.</b> Microscopía confocal de fluorescencia de la proteína TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> purificada y refoldada conjugada con FITC en espermatozoides congelados/descongelados. ....	108
<b>Figura 25.</b> Evaluación del patrón de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y sustratos de PKA en espermatozoides congelados/descongelados incubados con TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> .....	109
<b>Figura 26.</b> Movilidad total de espermatozoides congelados/descongelados incubados durante 0, 30, 60, 90 y 120 minutos con 0 (control), 0,15 $\mu$ M o 0,3 $\mu$ M de TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> .....	111
<b>Figura 27.</b> Efecto del agregado de TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> a espermatozoides congelados/descongelados sobre el porcentaje de fecundación <i>in-vitro</i> heteróloga. ....	112

## INDICE DE TABLAS

### Capítulo II

<b>Tabla 1.</b> Parámetros cuali/cuantitativos de muestras seminales de carnero obtenidas con vagina artificial (VA) y electroeyaculación (EE). .....	43
<b>Tabla 2.</b> Parámetros cuali/cuantitativos de muestras seminales congeladas/descongeladas de carnero obtenidas con vagina artificial (VA) y electroeyaculación (EE). .....	43

### Capítulo III

<b>Tabla 3.</b> Cinética de espermatozoides ovinos tratados con plasma seminal o sus proteínas colectados con vagina artificial y electroeyaculador evaluados a tres tiempos de incubación (15, 30, 45 min).....	69
<b>Tabla 4.</b> Cinética de espermatozoides ovinos tratados con plasma seminal o sus proteínas colectados con vagina artificial y electroeyaculador evaluados luego de una hora de incubación. ....	71
<b>Tabla 5.</b> Calidad de espermatozoides ovinos tratados con plasma seminal o sus proteínas colectados con vagina artificial y electroeyaculador .....	73
<b>Tabla 6.</b> Variables cinemáticas de las subpoblaciones espermáticas (CL) definidas en semen ovino congelado/descongelado .....	77

### Capítulo IV

<b>Tabla 7.</b> Cuantificación densitométrica de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y sustratos de PKA en espermatozoides criopreservados luego de su incubación con 0,15 $\mu$ M o 0,30 $\mu$ M de TrxA-FNIIx4-His <sub>6x</sub> .....	110
---	-----

### Anexo

<b>Tabla 8.</b> Proteínas del plasma seminal ovino expresadas diferencialmente en eyaculados colectados con vagina artificial y electroeyaculación .....	142
--	-----

<b>Tabla 9.</b> Análisis general del modelo lineal de los patrones de movilidad de las subpoblaciones entre tratamientos (carneros con baja o alta fertilidad). .....	143
<b>Tabla 10.</b> Análisis general del modelo de efectos mixtos lineales de los patrones de movilidad de las subpoblaciones entre tratamientos dentro de la estación reproductiva o contraestación. ....	144
<b>Tabla 11.</b> Efecto de los patrones de movilidad de la subpoblación entre los tratamientos dentro de estación reproductiva o en contraestación. ....	145

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

### Artículos en revistas científicas con referato internacional publicados

**LEDESMA, A.**; MANES, J.; CESARI, A.; ALBERIO, R.; HOZBOR, F. 2014. Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in *Corriedale* rams. *Rep Dom Anim.* 49, 324-332.

**LEDESMA, A.**; MANES, J.; RIOS, G.; ALLER, J.; ALBERIO, R.; HOZBOR, F. 2015. Effect of seminal plasma on post-thaw quality and functionality of *Corriedale* ram sperm obtained by electroejaculation and artificial vagina. *Rep Dom Anim.* 50, 386-392.

**LEDESMA, A.**; FERNANDEZ-ALEGRE, E.; CANO, A.; HOZBOR, F.; MARTINEZ-PASTOR, F.; CESARI, A. 2016. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Anim Reprod Sci.* 173, 35-41.

**LEDESMA, A.**; ZALAZAR, L.; FERNANDEZ-ALEGRE, E.; HOZBOR, F.; CESARI, A.; MARTINEZ-PASTOR, F. 2017. Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. *Anim Reprod Sci.* 184, 44-50.

### Capítulo de libro

HOZBOR, F.; **LEDESMA, A.** Avances en la utilización de plasma seminal para mejorar la calidad del semen congelado en especies de interés pecuario. En: *Biología de la gameta masculina, desde lo básico a nuevos enfoques para preguntas conocidas.* Editorial de la Universidad Nacional de Mar del Plata, EUDEM Cap. 5.2.5. pp 79-92. 2014.

### Artículos en revistas científicas con referato nacional publicados

**LEDESMA, A.**; MANES, J.; ALBERIO, R.; HOZBOR, F. 2013. ¿Es posible mejorar la fertilidad del semen ovino criopreservado mediante la adición de plasma seminal? *Taurus.* ISSN 1515-3037. N° 59.

**Resúmenes en eventos científicos**

**LEDESMA, A.;** FERNANDEZ-ALEGRE, E.; CESARI, A.; HOZBOR, F.; MARTINEZ-PASTOR, F.2016. Interacting Seminal Plasma Proteins Revert Capacitation in Ram Sperm. ESDAR, Lisbon, Portugal.

**LEDESMA, A.;** CESARI, A.; GIL, J.2014. Efecto del método de colecta seminal sobre la composición proteica del plasma seminal ovino. 4º Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal-INITRA, Buenos Aires, Argentina.

## RESUMEN

La aplicación de la inseminación artificial (IA) en cualquier especie requiere del mantenimiento del semen en condiciones no fisiológicas. En ovinos, la IA con semen refrigerado se encuentra más difundida que con semen congelado debido a los bajos porcentajes de preñez obtenidos con este último. Estos resultados se deben a la complejidad del cérvix de la oveja, que dificulta el paso del instrumental de IA y deposición del semen en la luz uterina, y a la mayor sensibilidad espermática a la criopreservación. Una de las razones de la baja fertilidad obtenida con semen congelado sería la criocapacitación, debida a una redistribución lipo-protéica de la membrana plasmática durante la congelación. En estudios previos del grupo se observó que la calidad espermática se ve afectada por el método de colecta, por lo que se hipotetizó que podría relacionarse al contenido de plasma seminal (PS) de los eyaculados y que esto, a su vez, influiría en la sensibilidad espermática a la criopreservación. Se compararon eyaculados obtenidos con vagina artificial (VA) y electroeyaculador (EE) en estado fresco y luego de la criopreservación y los componentes proteicos del PS. Se observó que, los eyaculados frescos obtenidos con EE presentaron mayor calidad, proporción de PS y contenido de proteínas totales. Ha sido demostrado que las proteínas del PS previenen/revierten algunos de los daños ocasionados por la congelación y mantienen a los espermatozoides en un estado no capacitado. Este efecto se debería a una fracción del PS compuesta por proteínas que interactúan con la superficie espermática (PPSiE), pertenecientes a una familia de proteínas compuestas por un doble dominio de fibronectina tipo II (FN-II). Luego de analizar el efecto del agregado de las PPSiE a espermatozoides criopreservados se observó que su adición revirtió la criocapacitación, sin diferencias entre métodos y estaciones de colecta. Con el objetivo de establecer si las subpoblaciones espermáticas influyen en el efecto de determinados tratamientos se llevó adelante su caracterización en semen criopreservado en base a sus características de movilidad y se comparó la distribución en carneros de alta y baja fertilidad. Fueron distinguidas cuatro subpoblaciones en el semen descongelado distribuidas diferencialmente según la fertilidad del reproductor. Al evaluar el efecto de las PPSiE se observó interacción entre el tratamiento y la estación de colecta y diferencias según el método de colecta, opuestamente a lo observado al analizar a la población en conjunto sin distinguir entre poblaciones. Destacando los inconvenientes que ocasiona ignorar la variabilidad de las muestras seminales. Los resultados obtenidos demostraron que las proteínas del PS son capaces de revertir los daños ocasionados por la criopreservación, pero

debido a que su concentración como la capacidad para proteger a los espermatozoides es muy variable, se planteó la expresión de un péptido recombinante compuesto por cuatro dominios de FN-II, que podría llevar adelante la actividad crioprotectora. Se logró expresar en *E. coli* una proteína compuesta por tiorredoxina, cuatro dominios de FN-II y un tag de histidina y se observó que esta se unió preferentemente a la región acrosomal y pieza media de los espermatozoides, siendo capaz de revertir la fosforilación en sustratos de PKA y al ser utilizada en la concentración 0,3  $\mu$ M aumentó el porcentaje de fecundación *in vitro*. Los resultados obtenidos podrían servir para el desarrollo de estrategias biotecnológicas para mejorar la calidad y la capacidad fecundante del semen ovino criopreservado.

**Palabras clave:** Plasma seminal, criopreservación, capacitación espermática.

## ABSTRACT

The application of artificial insemination (AI) in any species requires the maintenance of semen under non-physiological conditions. In sheep, AI with refrigerated semen is more widespread than with frozen semen due to the low percentages of pregnancy obtained. These results are due to the complexity of the sheep's cervix, which makes it difficult to pass the AI instruments and deposition of the semen in the uterine lumen and to the greater sperm sensitivity to cryopreservation. One of the reasons for the low fertility obtained with frozen semen would be cryocapacitation, due to a lipoprotein redistribution of the plasma membrane during freezing. In previous studies of the group it was observed that the sperm quality is affected by the collection method, so it was hypothesized that it could be related to the seminal plasma (SP) content of the ejaculates and that this, in turn, would influence the sperm sensitivity to cryopreservation. Ejaculates obtained with artificial vagina (AV) and electroejaculation (EE) were compared in fresh and after cryopreservation and the SP protein components. It was observed that, fresh ejaculates obtained with EE presented higher quality, proportion of SP and total protein content. It has been shown that SP proteins prevent/reverse some of the damage caused by freezing and keep the sperm in a non-capacitated state. This effect is due to a fraction of the SP composed of proteins that interact with the sperm surface (PPSiE), belonging to a family of proteins composed of a double domain of fibronectin type II (FN-II). After analyzing the effect of adding the PPSiE to cryopreserved spermatozoa, it was observed that their addition reversed the cryocapacitation, without differences between methods and collection seasons. In order to establish how sperm subpopulations could influence the effect of certain treatments, their characterization in cryopreserved semen was carried out based on their motility characteristics, and the distribution in rams of high and low fertility. Four subpopulations in the thawed semen were differentially distributed according to the reproductive fertility. When evaluating the effect of the PPSiE, interaction between the treatment and the collection season was observed and differences according to the collection method, opposite to what was observed when analyzing the population as a whole without distinguishing between populations. Highlighting the inconvenience caused by ignoring the variability of the seminal samples. The results obtained showed that SP proteins are capable of reversing the damage caused by cryopreservation, but because their concentration as the ability to protect sperm is very variable, the expression of a recombinant peptide composed of four domains of FN-II was proposed

which could carry out the cryoprotective activity. It was possible to express a protein composed of thioredoxin, four domains of FN-II and a histidine tag. It was observed that this was preferentially bounded to the acrosomal region and middle piece of the sperm, being able to reverse the phosphorylation in PKA substrates and when used in the concentration 0.3  $\mu$ M increased the percentage of *in vitro* fertilization. The results obtained could be used to develop biotechnological strategies to improve the quality and fertility of cryopreserved sheep semen.

**Keywords:** Seminal plasma, cryopreservation, sperm capacitation.

# **Capítulo I**

## **Introducción general**

### 1.1. Anatomía y fisiología del espermatozoide de mamífero

El espermatozoide es la gameta masculina, producida en el epitelio de los túbulos seminíferos de los testículos durante un proceso fisiológico denominado espermatogénesis. Es una célula haploide, altamente especializada, cuya función es transportar la información genética del macho hacia la gameta femenina.

Esta célula tiene una longitud de 135 $\mu$ m y se compone de una cabeza y una cola, ambas unidas por una zona estrecha denominada cuello o porción intermedia, delimitadas en su conjunto por la membrana plasmática (MP) (Fig.1). La forma y dimensiones de la cabeza y la cola varían según la especie. El espermatozoide ovino tiene forma de espátula, una cabeza chata de forma oval de 8 $\mu$ m de largo y menos de media micra de espesor (Curry *et al.*, 1996).

La cabeza está constituida principalmente por el núcleo, dentro del cual se halla el material genético necesario para la fecundación del ovocito. El ADN se encuentra muy condensado con la finalidad de ocupar el menor espacio posible. Esto se logra gracias a que las proteínas específicas que unen el ADN, llamadas histonas, en los espermatozoides fueron reemplazadas por protaminas, lo que permite reducir el volumen de la célula y aumentar sus propiedades hidrodinámicas, favoreciendo el proceso de fertilización (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). La cabeza se encuentra rodeada en sus 2/3 anteriores por una envoltura especial derivada del aparato de Golgi, llamada saco acrosomal o acrosoma. El acrosoma de un espermatozoide maduro se puede definir en términos de varios compartimentos estructurales. La vesícula acrosomal intacta está rodeada por una membrana continua compuesta por una membrana acrosomal externa y una interna. La membrana externa se asocia estrechamente con la membrana plasmática que recubre el acrosoma y la interna está pegada a la membrana nuclear (Eddy; O'Brien, 2006). La luz acrosomal contiene componentes solubles y una estructura llamada matriz acrosomal (Kim *et al.*, 2001; Buffone *et al.*, 2008). Durante la exocitosis acrosomal, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan para formar vesículas que se desprenden de los espermatozoides, revelando la membrana acrosomal interna como un nuevo dominio de la membrana plasmática. Tras esta fusión los componentes solubles del acrosoma se difunden libremente mientras la matriz acrosomal permanece expuesta en la superficie del espermatozoide hasta que se descompone y sus componentes se liberan. El acrosoma es crítico para la fertilización de mamíferos. Los espermatozoides deben

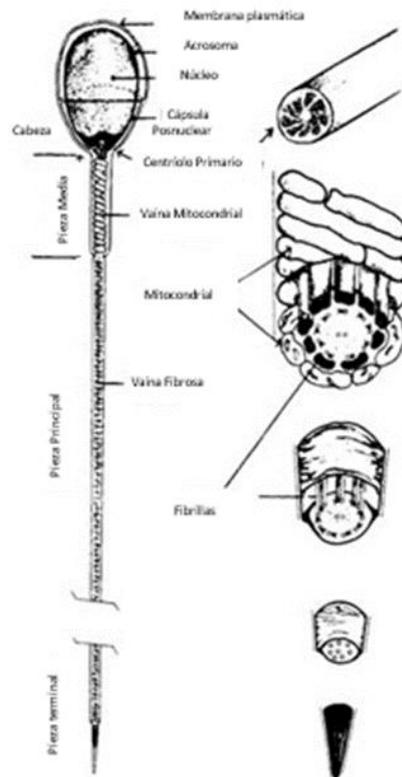
tener acrosomas adecuadamente formados para ser funcionales en el proceso de fertilización. Se ha observado, tanto en humanos como en ratones, que las mutaciones que afectan la formación o función del acrosoma generan infertilidad o subfertilidad severa (Dam *et al.*, 2007; Lin Y-Net *et al.*, 2007). Los espermatozoides de los mamíferos deben someterse a una exocitosis acrosómica para penetrar en la zona pelúcida (ZP) que rodea al óvulo (Ikawa *et al.*, 1997). Después de la exocitosis, la región posterior del acrosoma, conocido como el segmento ecuatorial, se involucra en la fusión de la membrana con el ovocito (Oura; Toshimori, 1990).

El cuello (o pieza de unión) es corto (0,5  $\mu\text{m}$ ) y contiene el centriolo proximal, esta zona es propensa a sufrir perturbaciones en el proceso de maduración durante el tránsito epididimario.

La cola o flagelo es proporcionalmente larga y es la que permite realizar los movimientos para su traslación. Puede dividirse en tres regiones: pieza intermedia, pieza principal (de mayor longitud) y pieza terminal. Internamente, el flagelo, se encuentra recorrido por un par de microtúbulos centrales rodeados por otros nueve pares de microtúbulos, cercados, a su vez, por nueve fibras externas más gruesas. En la pieza intermedia se encuentra una agrupación de mitocondrias en forma de cinturón (vaina mitocondrial), que se ubica entre las fibras gruesas y la MP. Las mitocondrias, a través de sistemas enzimáticos, son las encargadas de proveer la energía necesaria para el movimiento (Eddy; O'Brien, 2006). Las fibras externas son contráctiles y los microtúbulos sirven para conducir el impulso a lo largo de la cola.

El movimiento del conjunto de gametas genera una onda de masa visible macroscópicamente, que también puede ser evaluado microscópicamente de acuerdo a la velocidad de las olas u ondas generadas (movilidad masal microscópica). Los espermatozoides ovinos sanos y vitales se desplazan a una velocidad aproximada de  $100\mu\text{m}/\text{min}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ .

El espermatozoide posee un metabolismo de neta degradación ya que toma sustancias del medio líquido que lo rodea o de su propia estructura y con ello genera la energía necesaria para su movimiento. La toma de oxígeno refleja el consumo de estas sustancias y es aproximadamente de 5-20  $\mu\text{l}$  por cada mil millones de células/hora, pero este consumo y, por ende, su actividad, varían con la temperatura, razón por la cual, es necesario mantener constante la temperatura del semen destinado a evaluación, utilización directa o preservación.



**Figura 1. Estructura de un espermatozoide de mamífero** (adaptado de Arthur S.H. Wu, Oregon State University)

### 1.1.1. Composición de las membranas espermáticas

La membrana plasmática (MP) actúa como barrera estructural e interface de comunicación con el medio extracelular, transmitiendo señales bioquímicas originadas de interacciones entre el ligando y el receptor (Olden *et al.*, 1985). La integridad de la MP es de vital importancia para el correcto funcionamiento del espermatozoide, debido a su limitada capacidad biosintética y elevada especialización (Parks; Graham, 1992). Tal es así, que la integridad de la MP se considera un elemento fundamental para el éxito de la fecundación. Por lo tanto, tiene algunas particularidades con respecto a las MP de las células somáticas.

El modelo básico de membranas biológicas según Singer y Nicholson (1972) es el de una bicapa lipídica conformada por glicoproteínas y glicolípidos unidos por interacciones no covalentes, su fluidez y permeabilidad selectiva son cualidades muy importantes, que se deben a su composición de abundantes fosfolípidos y proteínas asociadas.

Los lípidos componen el 30-50% de la membrana, están íntimamente involucrados en la transducción de señales y pueden modular la función de las proteínas. Estos se encuentran anclados a su posición, aspecto que resulta importante para la fertilización, ya que la fusión de los gametos masculino y femenino requiere la participación particular de un microambiente lipídico. El conjunto de lípidos es muy importante en la regulación de los cambios de la composición de la MP de los espermatozoides durante los procesos de maduración y capacitación (Sanocka; Kurpisz, 2004).

La composición lipídica de la MP de los espermatozoides es notablemente diferente a las MP de las demás células somáticas (Martínez; Morros, 1996). Se ha determinado que en su superficie existe un alto nivel de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, difosfatidilglicerol, esterol y lípidos neutros, que representan el 70-80%, así como un alto nivel de ácidos grasos y glucolípidos. Jones y Mann (1977) observaron que en todos los fragmentos de la MP espermática el ácido graso poliinsaturado docosahexaenóico es altamente predominante, con lo cual, se le adjudicó un rol imprescindible en la regulación de la fluidez de la MP (Martínez; Morros, 1996).

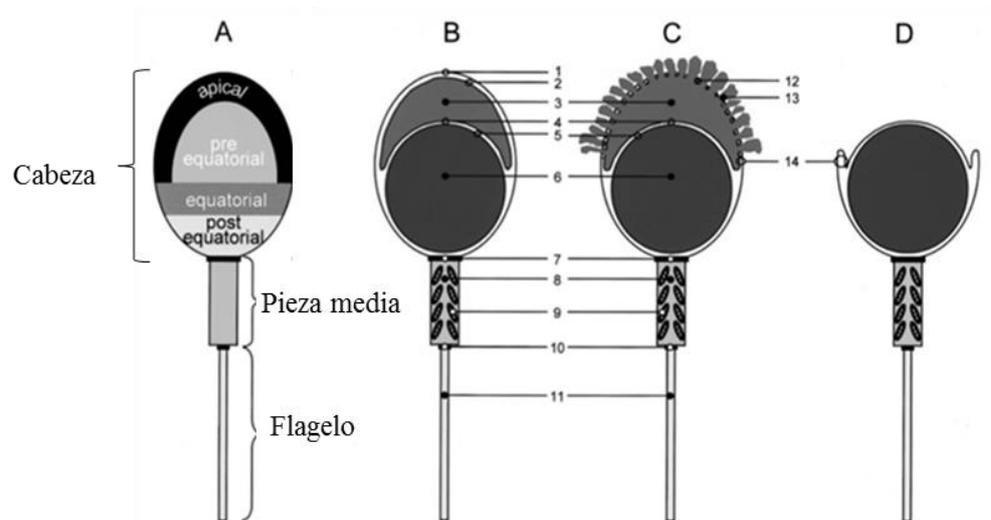
A su vez, existen diferencias entre especies. La MP de los espermatozoides ovinos difiere de las de otras especies como bovinos y humanos, ya que el espermatozoide ovino posee niveles muy elevados de fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados y niveles muy bajos de colesterol. La relación ácidos grasos poliinsaturados/saturados (fosfolípidos/colesterol) podría influir en la sensibilidad de la MP al daño debido a las bajas temperaturas. Darin-Bennett y White (1975) establecieron una relación molar alta de colesterol: fosfolípidos en la MP de espermatozoides humanos y de conejos en comparación con la relación molar del ovino y bovino (1:0 y 0:4, respectivamente). Esta relación elevada tendría su origen en una membrana más compacta y menos permeable, como es el caso de las dos primeras especies.

Las proteínas realizan diversas funciones, entre ellas, transportar moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula; actuar como enzimas o catalizadores de reacciones y actuar como receptores en la transducción de señales. La distribución de las proteínas en la MP también cambia marcadamente entre la cola, la pieza media y el acrosoma. Cuando se comparan las proteínas de la MP espermática con las de otros tipos celulares, los espermatozoides probablemente exhiben el más alto grado de polaridad, reportándose entre las

proteínas específicas de la membrana espermática: -1,4 galactosiltransferasa, fucosiltransferasa, -d-manosidasa, sp56, p95, entre otras (Benoff, 1997).

La MP de los espermatozoides de mamíferos está compartimentada en 5 regiones o macrodominios principales (Fig. 2). En la zona de la cabeza se distinguen 3 de ellos, cubriendo las regiones acrosomal, ecuatorial y postacrosómica y en el flagelo se evidencian dos, que corresponden a la pieza intermedia y a la principal. Estos sitios se diferencian bioquímica y funcionalmente entre sí y cada uno contiene una dotación definida de proteínas y lípidos (Holt; North, 1984). Dentro de estos compartimentos se encuentran los rafts lipídicos, microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, que poseen un elevado nivel de compactación y confieren un alto punto de fusión y un fuerte carácter de insolubilidad a detergentes no iónicos a bajas temperaturas. Además de éstos, se encuentran los microdominios de proteínas, formados por moléculas muy dinámicas en respuesta a los estímulos externos (temperatura) e internos (reordenamiento del citoesqueleto) (Edidin, 1997). Los macrodominios antes citados son establecidos durante la diferenciación testicular y han sido identificados en espermatozoides de diferentes especies (Girouard *et al.*, 2008) y relacionados con la capacitación espermática (Shadan *et al.*, 2004; Van Gestel *et al.*, 2005).

La primera separación entre la MP que recubre la cabeza y la cola está dada por una alineación de proteínas transmembranales que forman el cuello o anillo posterior, mientras que la segunda, entre la pieza intermedia y la principal del flagelo, se debe a la presencia de un anillo. En la gameta madura ambas estructuras parecieran jugar un rol importante durante la maduración y capacitación espermáticas (Bartles, 1995; Wolf, 1995).



**Figura 2. Representación esquemática del espermatozoide y sus dominios.** A: Divisiones en la cabeza: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial. B, C y D: Representan cortes transversales de la célula. 1: membrana plasmática. 2: membrana acrosomal externa. 3: contenido del acrosoma. 4: membrana acrosomal interna. 5: envoltura nuclear. 6: núcleo. 7: anillo posterior. 8: pieza intermedia. 9: mitocondrias. 10: anillo anular. 11: flagelo. 12: vesícula tras la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. 13: secreción acrosomal. 14: estructura formada de la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal interna (Extraído de Fleisch; Gadella, 2000).

## 1.2. Capacitación espermática

Los espermatozoides de los mamíferos, luego de la maduración a lo largo del epidídimo, son almacenados en la cola de este órgano donde se encuentran inmóviles y estables, adquieren la movilidad posteriormente, al ser eliminados con el eyaculado en un proceso condicionado por los constituyentes del plasma seminal. Luego, los espermatozoides móviles, pero aún incapaces de fecundar al ovocito logran esta aptitud tras un tiempo de permanencia en el tracto genital de la hembra, a través de un fenómeno fisiológico denominado capacitación, que involucra cambios estructurales, bioquímicos y fisiológicos que causan la reorganización de las proteínas y lípidos presentes en su MP (Cross, 2003; 2004; Harrison; Gadella, 2005). Entre los eventos más importantes que ocurren en el espermatozoide dentro este proceso se encuentran la alteración de la relación colesterol/fosfolípidos de la MP, ya que sale colesterol, lo que ocasiona incremento en la fluidez de la misma, de su permeabilidad y de la capacidad de fusionarse. La depleción del colesterol parece ser el evento disparador en la cascada de cambios

iónicos intracelulares y vías de señalización (Yeagle, 1991); activación de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  y de  $\text{Na} / \text{K}^{+}$ , con el subsecuente aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Arnoult et al., 1996); fosforilación del residuo de tirosina de las proteínas (Flesch et al., 1999); aumento del AMPc y activación de la cascada de segundos mensajeros, con la consiguiente generación de radicales libres. Estos radicales libres o especies reactivas de  $\text{O}_2$  (ROS), juegan un rol importante en la cascada de eventos que llevan a la capacitación, aunque cuando su producción es exagerada puede tener un efecto tóxico para la célula debido a su elevada reactividad. La toxicidad se relaciona con la ionización y consecuente inactivación de proteínas, daño del ADN y peroxidación de los lípidos insaturados. Los espermatozoides son particularmente susceptibles al daño oxidativo porque poseen en sus membranas una gran cantidad de lípidos insaturados, por su incapacidad de resintetizar componentes de membrana y por la limitada capacidad de sus sistemas antioxidantes. La peroxidación de los lípidos desestabiliza las membranas lo que conlleva a la muerte celular (De Lamirande et al., 1998).

El estado de capacitación puede ser determinado *in vitro* mediante pruebas de fertilización, inducción de la reacción acrosómica en respuesta a agentes biológicos (ZP, progesterona), y por la medición de signos moleculares de capacitación como el incremento de calcio mediante la prueba de la Clortetraciclina (Prueba de la CTC) (Pérez et al., 1996) y la evaluación de la actividad de PKA y tirosina-quinasa mediante la detección de fosforilación en residuos Ser/Thr y Tyr respectivamente. La capacitación da lugar finalmente a dos grandes procesos fisiológicos: la hiperactivación y la reacción acrosomal.

### 1.3. Hiperactivación espermática

La capacitación espermática está relacionada con un cambio en el movimiento del espermatozoide, más específicamente del flagelo, desde un tipo de movimiento progresivo hacia movimientos vigorosos similares a los golpes de un látigo, este cambio es conocido como hiperactivación espermática (Chamberland et al., 2001). La hiperactivación se caracteriza por un movimiento flagelar marcado, movimiento de la cabeza del espermatozoide hacia los lados y una trayectoria no lineal (Baldi, 1996). Hay ejemplos de casos en los que la capacitación y la hiperactivación pueden dissociarse experimentalmente (Neill; Olds-Clarke, 1987),

pero todavía no se puede argumentar que la hiperactivación represente un evento completamente independiente del proceso de capacitación (Suarez, 1996).

#### 1.4. Reacción acrosomal

La reacción acrosomal es un proceso vital para la penetración espermática a la zona pelúcida y para la posterior fusión del espermatozoide con la MP del ovocito. Se postula que cambios en la permeabilidad de la MP al  $\text{Ca}^{++}$  dispararían una señal de inicio para la reacción acrosomal. El aumento intracelular de este ion induciría un aumento del AMPc con la consiguiente activación de las fosfolipasas ( $A_2$ , C) asociadas a la membrana. Así, durante la reacción acrosomal ocurre una fusión y vesiculación de la MP y membrana acrosomal externa, con la consiguiente exocitosis de las enzimas del acrosoma (hialuronidasa y proteasas como acrosina) (Gadella, 2008). Esta fusión resulta en la liberación del contenido acrosomal y la exposición de nuevos dominios de membrana, esenciales para la fertilización. En la actualidad existen reportes contradictorios acerca del lugar de ocurrencia de la reacción acrosomal. Se ha puesto en discusión si la misma se inicia antes o luego de que el espermatozoide se una a la zona pelúcida, aunque sí se conoce que es un requerimiento imprescindible para la fusión de gametas (Jin *et al.*, 2011; Yanagimachi, 2011; Klinovska *et al.*, 2014) y revisado en (Buffone *et al.*, 2014). Únicamente los espermatozoides capacitados, son capaces de penetrar las células del cúmulus (capa de células foliculares que rodea al ovocito), unirse al receptor espermático en la superficie del ovocito y desencadenar la reacción acrosomal permitiéndole al espermatozoide la penetración hacia el espacio perivitelino y la exposición de ciertas regiones de su cabeza que participan en la fusión con el ovocito durante la cual se establece una continuación entre los citoplasmas de ambas gametas (Evans, 2012; Okabe, 2013; Klinovska *et al.*, 2014).

La capacitación espermática y reacción acrosomal están encadenados y finalizan con la fecundación del ovocito o con la muerte del espermatozoide. Por lo tanto, si ocurren de manera anticipada, se producirá una asincronía con el momento de la ovulación, comprometiéndose la fertilización (Yanagimachi, 1994).

### 1.5. Mecanismo general de la fertilización

La fertilización es un proceso complejo que involucra múltiples etapas, las cuales culminan en la fusión de las membranas, de los citoplasmas de las gametas y finalmente de sus genomas. Únicamente los espermatozoides capacitados, son capaces de penetrar las células del cúmulus (capa de células foliculares que rodea al ovocito), unirse al receptor espermático en la superficie del ovocito y desencadenar la reacción acrosomal permitiéndole al espermatozoide la penetración hacia el espacio perivitelino y la exposición de ciertas regiones de su cabeza que participan en la fusión con el ovocito durante la cual se establece una continuación entre los citoplasmas de ambas gametas (revisado en (Evans, 2012; Okabe, 2013; Klinovska *et al.*, 2014).

Si bien la fusión es un evento clave, aun no se conoce completamente el mecanismo ni la maquinaria fusogénica exacta que está involucrada. En los últimos años, se han focalizado los esfuerzos en identificar a las moléculas protagonistas en este proceso. Se conoce que la proteína IZUMO1 del espermatozoide es crucial en la fusión, observándose que ratones knock-out son completamente infértiles dada la imposibilidad de los espermatozoides de fusionar (Inoue *et al.*, 2005). Si bien se ha encontrado que varias proteínas interactúan lateralmente con IZUMO1 en la membrana espermática (Ellerman *et al.*, 2009), JUNO, es la única proteína del oolema reportada que interactúa sólidamente, aunque la combinación exacta de causas/efectos aún no está del todo clara.

### 1.6. Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) es la herramienta biotecnológica más importante que contribuye al desarrollo de la producción animal. A través de esta técnica un eyaculado de un reproductor genéticamente superior puede ser utilizado para fecundar múltiples hembras y así mejorar la genética de la cría.

La criopreservación de semen ha incrementado las ventajas de la IA sobre la reproducción natural, ya que permite la preservación de genes de importancia para su uso futuro, facilita el transporte de las gametas a través de largas distancias, reduce costos al disminuir el número de animales en el campo, permite que un gran número de hembras puedan ser inseminadas en diferentes momentos del año y proporciona un seguro contra la pérdida de un reproductor en particular.

La aplicación de la IA con semen congelado ha alcanzado el mayor impacto en los programas de mejoramiento genético de la especie bovina logrando elevadas tasas de preñez, mediante la combinación de la buena calidad del semen luego de su criopreservación y la practicidad de la técnica, que permite depositar el semen directamente en el útero. Sin embargo, en la especie ovina el uso masivo de la IA se limita a la aplicación de semen fresco/refrigerado depositado por la vía cervical, ya que el empleo de semen congelado/descongelado por la misma vía genera porcentajes de preñez que no superan el 40% (Maxwellet *al.*, 1999; Gil *et al.*, 2003; Donovan, 2004).

Las bajas tasas de preñez utilizando semen congelado en ovinos se deben principalmente a dos factores, por un lado, a la compleja anatomía del cérvix de la oveja que, a diferencia de lo mencionado en bovinos, impide la deposición del semen directamente en la luz uterina. Por otro lado, como consecuencia de los procesos de congelación y descongelación, la vida media de los espermatozoides se ve reducida y su capacidad fecundante alterada. Una alternativa para aumentar los porcentajes de preñez obtenidos con semen congelado en ovinos es la aplicación de IA por la vía laparoscópica. Esta práctica consiste en la deposición de semen congelado/descongelado directamente dentro del útero de la oveja, logrando sortear la barrera que supone el cérvix uterino. Su ventaja principal es la obtención de altos valores de preñez (60/70 %). Sin embargo, presenta varias dificultades como el estrés que provoca en los animales debido a su invasividad, sus elevados costos y la necesidad de contar con personal calificado y equipamiento especializado. Por lo tanto, la mejora de la sobrevida y la disminución de las lesiones debidas a la criopreservación aumentarían la capacidad fecundante del semen posibilitando su uso por vía cervical.

### **1.7. Congelación de semen: características generales**

La congelación es una técnica mediante la cual se puede conservar una célula a temperaturas extremadamente bajas, permitiendo que su metabolismo se reduzca absolutamente sin que pierda su potencial vital (Watson, 1986). Según Santiani (2003) involucra los siguientes pasos:

- Reducción de la temperatura
- Deshidratación celular

- Congelación
- Descongelación

El objetivo de la criopreservación de semen es conservar el poder fecundante de los espermatozoides a través del mantenimiento latente de un metabolismo celular activo para producir energía y llevar a cabo las funciones espermáticas (Abdelhakeam *et al.*, 1991).

Hasta el momento no se ha desarrollado ningún protocolo de congelación que garantice la total integridad de las estructuras que deberían ser conservadas. El daño celular es el principal impedimento para una criopreservación exitosa, con lo cual, la fertilidad obtenida con semen congelado es mucho menor que con semen fresco (Watson, 2000).

Los espermatozoides de los mamíferos son sensibles al enfriamiento. Sin embargo, esta sensibilidad es especie-específica, por un lado, debido a la forma y tamaño de cada espermatozoide y por el otro, debido a las características biofísicas y bioquímicas de las membranas plasmáticas que difieren entre especies e individuos de la misma especie (Curry, 2007). Los espermatozoides ovinos son más sensibles al daño estructural (físico) que los de otras especies como bovinos, conejos y humanos. Se ha demostrado que esto responde, en parte, a la composición lipídica de sus membranas plasmáticas que presentan una mayor relación ácidos grasos poliinsaturados /saturados con bajo contenido de colesterol (White, 1993). Por lo tanto, los sistemas de congelación no son extrapolables entre las distintas especies.

### **1.7.1. Efecto del descenso térmico sobre las estructuras celulares**

Los procesos de criopreservación ocasionan un nivel de estrés celular que varía según la magnitud del descenso térmico al que son expuestas las células e incluye dos tipos de estrés debidos al:

#### **1.7.1.1. Choque térmico o *cold shock***

Se denomina así, al daño que exhiben las células espermáticas ante una rápida disminución de la temperatura, en un rango que oscila entre los 30 y los 0 °C (Watson, 1995). En general, la mayor severidad de los efectos negativos en espermatozoides ovinos se observa a los 15 °C y depende de la composición lipídica

de sus membranas. Para que se lleve a cabo esta alteración es importante el gradiente térmico y el tamaño de la célula. Este shock causa una pérdida irreversible de la movilidad espermática, daño y liberación de fosfolípidos con la consiguiente pérdida de permeabilidad selectiva y aumento de fluidez de las membranas. Ultraestructuralmente se manifiesta por disrupción de las membranas acrosomales y alteración de la función metabólica. Estudios con microscopía electrónica en espermatozoides sometidos a *cold-shock* revelaron disrupción de las membranas plasmáticas por sobre el acrosoma, la pieza media y el flagelo. En cuanto a las mitocondrias, mientras que sus membranas se mantienen intactas, en su interior se forman crestas pálidas y la matriz se condensa extremadamente (Simpson *et al.*, 1986).

#### **1.7.1.2. Congelamiento**

La estabilidad celular solo puede ser mantenida a temperaturas por debajo de los -130 °C, temperatura a la cual no se detectan reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula, tampoco existen evidencias de que puedan ocurrir cambios de índole genético. A temperaturas mayores, puede permanecer agua intracelular sin congelar, lo cual permite funciones metabólicas, causando degradación de la célula (Mazur, 1984). Por lo tanto, el problema en la criopreservación no está dado por la habilidad del espermatozoide para mantenerse viable a temperaturas menores a -130 °C, sino por el daño que ocurre durante el congelamiento y descongelamiento. Este daño depende de la velocidad a la que ocurran dichos procesos.

Cuando la temperatura desciende por debajo de los -5°C comienzan a formarse cristales extracelulares de agua pura, aumentando la concentración de sales en la porción de agua sin congelar (Pegg, 2007). Mazur (1984) sugirió que con tasas de congelación menores a la óptima (5 °C/min), las células estarían expuestas por un tiempo muy prolongado a concentraciones elevadas de solutos, sufriendo las consecuencias del aumento de pH y osmolaridad. La gran concentración de sales que queda en la porción no congelada causa la pérdida de proteínas de la membrana plasmática lo que somete a la célula a estrés osmótico y deshidratación (Watson; Duncan, 1988). Inversamente, a tasas de congelación superiores a la óptima (10-20 °C/min), el tiempo para que el agua salga de la célula es insuficiente, los cambios de volumen ocurren tan rápido que no le permiten a la membrana adaptarse. Por otro

lado, se forman cristales intracelulares muy pequeños que dañan mecánicamente a la célula. Estos cristales son termodinámicamente inestables, por lo que al ser descongelados tienden a agruparse (recristalización) y formar cristales más grandes, que resultan letales (Watson, 1986). Aunque hasta el momento no se conoce con exactitud de qué manera el proceso de recristalización daña a la célula. Fahy (1986) planteó que la célula se vuelve menos tolerante a los cambios bruscos de volumen y concentración cuando se encuentra a temperaturas por debajo de -5 °C.

En síntesis, es de vital importancia encontrar la tasa óptima de enfriamiento, ya que esta debe ser lo suficientemente lenta como para permitir que ocurra la deshidratación celular ordenada y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente rápida para prevenir el efecto negativo que tiene el aumento de la osmolaridad por la formación de cristales extracelulares.

### **1.7.1.3. Estructuras espermáticas perjudicadas durante la congelación**

La criopreservación de semen se asocia con alteración de la función espermática en general (Said *et al.*, 2010), disrupción de la actividad enzimática (Thundathile *et al.*, 1999), pérdida de fosfolípidos y proteínas de membrana, lo que afecta su permeabilidad selectiva y fluidez y en consecuencia genera disminución de la viabilidad espermática. Los daños producidos por efecto de la exposición a temperaturas descongelación pueden ser físicos y bioquímicos o funcionales. Los daños físicos van siempre acompañados de cambios bioquímicos e incluso con pérdida de contenido esencial (Salamon; Maxwell, 1995).

El daño ultraestructural es más severo en espermatozoides ovinos que bovinos y las estructuras más afectadas son las membranas plasmáticas y acrosomales, el acrosoma, la vaina mitocondrial y el axonema (Holt; North, 1984).

La membrana plasmática y acrosomal externa son las piezas más sensibles de los espermatozoides (Krogenaes *et al.*, 1994), por lo que, al hablar de crioinjurias se deben considerar sus propiedades termodinámicas y estructurales, ya que estas contienen un ordenamiento inusual de lípidos (Parks; Graham, 1992).

Con la congelación/descongelación se produce un reordenamiento de las cadenas de fosfolípidos, formándose regiones cristalinas. En algunas de estas regiones quedan líquidos sin congelar donde las proteínas se reagrupan y construyen puntos de comunicación que alteran la fluidez de la membrana (Parks; Graham, 1992).

Estudios realizados antes, durante y después de la congelación han demostrado que entre los 10 y 16 °C ocurre transición en los fosfolípidos de membrana desde una fase líquida-cristalina a una fase de gel (Grossmann; Santaló, 1991), volviéndose las membranas más rígidas, con migración lateral de fosfolípidos, reordenamiento de componentes de membrana y separación de fase en los lípidos (De Leeuw *et al.*, 1990). Estas alteraciones predisponen a las membranas a fusionarse, lo que afecta la actividad de las proteínas y la permeabilidad de las membranas al agua y a los solutos. El efecto dañino de esta separación depende de la combinación de elementos de membrana, de la relación colesterol/fosfolípidos y del grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas. Luego de la descongelación, estas alteraciones son sólo parcialmente revertidas.

Entre los daños físicos a nivel ultraestructural también se pueden mencionar el daño en las membranas debido a la oxidación de los lípidos y a los cambios bruscos de temperatura y volumen (Devireddy *et al.*, 2002), así como también, el daño debido a la formación/disolución de cristales de hielo (Hammerstedt *et al.*, 1990). Muldrew y McGann (1990) postularon que la ruptura de la membrana sería causada por la fricción del agua pasando rápidamente a través de ella, lo cual excedería su capacidad para conducirla. La ruptura de la membrana permitiría la entrada de hielo al interior de la célula por lo que, el hielo intracelular, sería más una consecuencia que una causa del daño.

Las alteraciones observadas en el axonema podrían ocasionar cambios en el transporte y permeabilidad de la membrana plasmática de la región del flagelo ocasionando disminución de la movilidad. Según Courtens *et al.* (1989) el axonema sería una de las porciones más afectadas durante la congelación, pero se reconstruiría durante la descongelación.

Las mitocondrias son organelas muy importantes en la homeostasis espermática, cuya actividad ha sido correlacionada con su movilidad y potencial fecundante. Su arquitectura se altera con la criopreservación, lo que provoca la disminución de los fenómenos de fosforilación oxidativa y transporte de protones, con la consecuente disminución de la producción de ATP (Watson, 1995). La injuria mitocondrial puede ser un factor que reduce la capacidad fecundante del semen ya que los espermatozoides congelados/descongelados tienen mayor inhabilidad para cruzar el cérvix (Winsor; White, 1995).

Otra estructura que se daña durante la criopreservación es el citoesqueleto, muchas de sus proteínas presentan polimerización y despolimerización según la temperatura, lo que podría tener implicancias significativas en la función del espermatozoide.

A causa de la congelación/descongelación también ocurren alteraciones bioquímicas en el espermatozoide, tales como pérdida de lipoproteínas y aminoácidos, disminución de la actividad de las enzimas del acrosoma, liberación de la enzima glutámico oxalacético transaminasa (GOT), disminución de la actividad de las fosfatasa, aumento del contenido de sodio y disminución de potasio y pérdida de prostaglandinas (Salamon; Maxwell, 1995). Al descender la temperatura por debajo de los 0 °C disminuye la actividad de la bomba Na-K<sup>+</sup> de la MP y la formación de ATP. Esto causa que el K<sup>+</sup> que sale de la célula fluya a una tasa mayor de la que entra, con lo cual la concentración de K<sup>+</sup> intracelular disminuye y la relación Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> se altera (Salamon; Maxwell, 1995). Esto causa una despolarización parcial de la membrana abriéndose los canales de Ca<sup>++</sup>, con el consecuente influjo de este ion, el cual activa las fosfolipasas, ocasionando una alteración general de las membranas (Bailey *et al.*, 2003).

En muchas especies han sido descritas otras alteraciones bioquímicas como modificaciones en la estructura de la cromatina como consecuencia de la desnaturalización del ADN (Gillan; Maxwell, 1999). Estos cambios bioquímicos y físico-ultraestructurales ocasionados por la congelación pueden ser los responsables de la disminución de la integridad funcional, supervivencia *in vivo* y capacidad fecundante de los espermatozoides (Salamon; Maxwell, 2000).

#### **1.7.1.4. Criocapacitación**

Entre los daños que genera el proceso de criopreservación en las células espermáticas quizás el más importante es el denominado “criocapacitación” (Reddy *et al.*, 2010), ya que ocasiona cambios similares a los que ocurren durante la capacitación *in vitro*. Algunos de estos cambios son la reorganización de las membranas, el aumento del Ca<sup>++</sup> intracelular y la fosforilación de tirosina de las proteínas (Kumar; Atreja, 2012; Singh *et al.*, 2012). Mientras que la reorganización de la membrana y el aumento de Ca<sup>++</sup> intracelular son muy similares en ambos procesos,

la fosforilación de las proteínas tiene un patrón diferencial y no se considera como una capacitación verdadera (Green, Watson 2001). Pérez-Pé *et al.* (1996) demostraron a través de la prueba de la clortetraciclina que los espermatozoides ovinos criopreservados experimentan capacitación más rápidamente que los recién eyaculados o frescos. Adicionalmente, Cormier *et al.* (1997) también confirmaron este efecto luego de observar que los espermatozoides criopreservados tenían la capacidad de fecundar ovocitos *in vitro* sin la necesidad de ningún tratamiento previo, como es requerido regularmente.

El mecanismo molecular por el que ocurre fosforilación de proteínas durante la criopreservación aún no se conoce completamente. Se sabe que la criopreservación genera fluctuaciones de temperatura y deshidratación celular que inducen la reorganización de los componentes lipídicos de las membranas, con pérdida de ácidos grasos poliinsaturados y de colesterol (Maldjian *et al.*, 2005; Chakrabarty *et al.*, 2007). Este daño inicial es suficiente para disparar la criocapacitación en los espermatozoides. La reorganización de las membranas aumenta su permeabilidad al agua y al  $\text{Ca}^{++}$  (Hagiwara *et al.*, 2009; Oldenhof *et al.*, 2010), activando la adenilato ciclasa que en consecuencia incrementa la generación de AMPc y 1,2 diacilglicerol, lo que resulta en capacitación a través del desencadenamiento de fosforilación (Kumaresan *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012).

Estudios previos reportaron que la reorganización estructural de la membrana de la cabeza espermática afecta negativamente su capacidad de interactuar con las células del tracto genital femenino y, por lo tanto, disminuyen su habilidad para adherirse a las células epiteliales del oviducto, al mismo tiempo que disminuye la vida media del espermatozoide (Bailey, 2003; Thomas *et al.*, 2006). Harrison (1996) describió a la criocapacitación como una “ventana” de desestabilización dentro de la cual los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar, pero son susceptibles a la degeneración de las membranas y a sufrir una reacción acrosómica espontánea si no logran fecundar.

La fase de descongelación es tan importante para la supervivencia de los espermatozoides como la fase de congelación, ya que deben volver a atravesar la zona de temperatura crítica. El efecto depende de que la tasa de congelación haya sido suficientemente alta como para inducir el congelamiento intracelular o lo suficientemente lenta como para provocar la deshidratación celular (Parks; Graham, 1992). En el primero de los casos, es requerida una descongelación rápida para

prevenir la recristalización del hielo intracelular presente en el espermatozoide (Mazur; Miller, 1976). La exposición abrupta y por un corto periodo a la elevada concentración de solutos y al glicerol, provoca una restauración del equilibrio intra y extracelular más rápida que en la descongelación lenta, sin embargo, Morozov (1959) propuso que el concepto de que cuanto más elevada la tasa de congelación más elevada debe ser la tasa de descongelación sólo se aplica al procesar volúmenes muy pequeños de semen.

### **1.8. Plasma seminal**

El plasma seminal (PS) es la porción líquida del eyaculado. Es un complejo biológico compuesto en una mínima proporción por fluido epididimario y casi en su totalidad por fluidos secretados por las glándulas sexuales accesorias (bulbo-uretrales, próstata y vesículas seminales). Sin embargo, la mayor proporción es originada en las vesículas seminales. Estas, acumulan sus productos en el lumen luego de que el macho alcance la pubertad y durante la eyaculación se mezclan con los espermatozoides y con el fluido epididimario, contribuyendo a aumentar el volumen del semen y a facilitar su tránsito por el tracto reproductivo (Moura *et al.*, 2006).

El PS no sólo actúa como vehículo para los espermatozoides eyaculados, sino que también es su soporte metabólico, aportándoles energía desde su formación hasta el transporte por el tracto genital de la hembra (Maxwell *et al.*, 2007). Además, protege a los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino, modulando la respuesta inflamatoria tras la monta y evitando que los espermatozoides vivos sean fagocitados en el útero (Alghamdi *et al.*, 2004; Troedsson *et al.*, 2005), también sirve de medio de transporte y eliminación de espermatozoides muertos (Loomis, 2006). El PS contiene un conjunto de moduladores claves de la funcionalidad espermática ya que realiza cambios hormonales, enzimáticos y modificación de la superficie de las membranas celulares (Muiño-Blanco *et al.*, 2008; Caballero *et al.*, 2012). Adicionalmente, activa a los espermatozoides, previamente inmóviles, protege a las membranas celulares de los daños peroxidativos e induce la ovulación en cerdos y camélidos (O'Leary *et al.*, 2004; Ratto *et al.*, 2005). Sin restarle importancia a lo descrito anteriormente, quizás la función principal del PS es la de prevenir la capacitación prematura de los espermatozoides, manteniéndolos en un estado no capacitado (Yanagimachi, 1994; Cross, 1996; Schoeneck *et al.*, 1996; Yeung *et al.*, 2006).

El componente mayoritario del PS es el agua (75-80%), contiene además sustancias orgánicas e inorgánicas. Entre los sustratos energéticos se encuentran fructosa, sorbitol y glicerilfosfolina. La fructosa es la sustancia orgánica más abundante y más fácilmente metabolizable que proporciona la mayor fuente de energía a los espermatozoides, además contiene iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Cl}_2$ . El PS también tiene otros componentes que se encuentran en muy bajas concentraciones entre ellos fosfolípidos, ácido ascórbico, aminoácidos, péptidos, lípidos, ácidos grasos y enzimas, además de constituyentes antimicrobianos como plasmina seminal e inmunoglobulinas. Asimismo, se han encontrado diversas hormonas como andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FSH, LH, hormona del crecimiento, insulina, glucagón, prolactina, relaxina, hormona liberadora tiroidea y encefalinas (Asadpour, 2012; Juyena; Stelletta, 2012).

El PS normalmente es isotónico y neutro, su pH se mantiene muy próximo a 7 gracias a un complejo sistema amortiguador. Entre sus constituyentes se destacan una amplia variedad de proteínas secretadas, en su mayoría, por las vesículas seminales. La adición y remoción de algunas de estas proteínas durante la maduración espermática en el epidídimo y la eyaculación es de gran importancia en el mantenimiento de la estabilidad de las membranas plasmáticas (Desnoyers; Manjunath, 1992), movilidad (Henricks *et al.*, 1998; Sánchez-Luengo *et al.*, 2004), interacción con el ovocito y fecundación (El-Hajj Ghaoui *et al.*, 2007). Algunas de estas proteínas son adsorbidas en la superficie de los espermatozoides y logran mantener la estabilidad de sus membranas hasta el momento de iniciar el proceso de capacitación en el tracto reproductivo femenino (Desnoyers *et al.*, 1994; Amann, 1999). A su vez, estas proteínas deben ser removidas en el momento apropiado para permitir la fecundación (Desnoyers; Manjunath, 1992). Se han encontrado correlaciones positivas entre contenido proteico, movilidad y viabilidad espermáticas, lo cual sugiere que las proteínas pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de la integridad y funcionalidad del espermatozoide (Catt *et al.*, 1997).

La mayor parte de las proteínas del PS pertenecen a una de las tres familias principales: proteínas compuestas por un dominio de fibronectina tipo II (Fn-II), también llamadas BINDER OF SPERM PROTEINS (BSP), proteínas secretoras ricas en cisteínas (CRISPs) y ESPERMADESINAS. La familia de proteínas Fn-II inicialmente fue descrita como las proteínas más abundantes en el PS bovino, previamente han sido llamadas BOVINE SEMINAL PLASMA PROTEINS (Manjunath, 1984). Esta familia se caracteriza por su bajo peso molecular (12–30 kDa) y por una

estructura secundaria común que contiene dos dominios de fibronectina en tándem y una extensión amino-terminal que es variable entre cada proteína. Proteínas homólogas a las BSP han sido identificadas también en equinos, caprinos, bisones, ovinos y como componentes menores en cerdos (Manjunath *et al.*, 2007, 2009). A su vez, estas pueden ser agrupadas en tres subfamilias (BSPH4, BSPH5 y BSPH6) (Fan *et al.*, 2006). El alto grado de conservación entre las diferentes especies de mamíferos indicaría la importancia de éstas en la reproducción. Se piensa que su función biológica está íntimamente relacionada a sus propiedades de unión, ya que se ha estudiado que pueden unirse a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), glicosaminoglicanos (GAGs), como heparina, heparán sulfato y condroitín sulfato y a componentes del fluido folicular y oviductal (Therien *et al.*, 2005). Ha sido establecido que estas proteínas se unen a la superficie espermática a través de la interacción con fosfolípidos del tipo colina presentes en la membrana del espermatozoide (Desnoyers; Manjunath, 1992).

Las proteínas secretoras ricas en cisteína o CRISPs, se caracterizan por la presencia de 16 residuos de cisteína conservados. Tres miembros de esta familia han sido identificados en mamíferos a lo largo del tracto reproductor de humanos, ratas, equinos y cerdos (CRISP1, CRISP2, CRISP3) y CRISP4 expresada en epidídimo de ratón (Jalkanen *et al.*, 2005; Koppers *et al.*, 2011). Las CRISPs están presentes desde estadios muy tempranos de la espermatogénesis y a lo largo del proceso de fertilización. Sin embargo, su rol en la reproducción aún no está claro, pero se hipotetiza que podrían regular canales iónicos. También se ha supuesto un posible rol de CRISP2 en la modulación de la actividad flagelar (Gibbs; O'Bryan, 2006) y de CRISP1 y CRISP2 en la modulación de la interacción espermatozoide-ovocito en ratas y ratones (Koppers *et al.*, 2011).

Las proteínas pertenecientes a la familia de las espermadesinas son un grupo de glicoproteínas de bajo peso molecular (12–16 kDa) detectadas en cerdos, toros, caballos y carneros (Calvete; Sanz, 2006; Melo *et al.*, 2008). Son proteínas multifuncionales con la capacidad de ligar desde heparina a fosfolípidos de la membrana espermática. Esta familia representa más del 90% del total de las proteínas del PS en cerdos, sus miembros se clasifican según la capacidad de unión a heparina (AQN-1, AQN-3, AWN) o no (PSP-I y PSP-II). Hasta el momento solo dos espermadesinas se han identificado en toros (aSFP y Z13) y una en equinos (HSP-7) y ovinos (RSP) (Calvete; Sanz, 2006). Como en el caso de la familia de proteínas Fn-II,

el rol biológico de estas proteínas a lo largo del proceso de fecundación está relacionado a su habilidad de unión a diferentes ligandos.

La concentración de los componentes proteicos del PS presenta variabilidad entre las distintas especies, entre animales de una misma especie e incluso entre eyaculados de un mismo animal (Pérez-Pé *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2008). Más aún, diferencias en la concentración de algunos de los elementos presentes en el PS podrían deberse a variaciones en la alimentación, manejo, métodos de detección, actividad de enzimas presentes y actividad metabólica de los espermatozoides (Juyena; Stelletta, 2012).

Ha sido demostrado que el PS tiene la capacidad de prevenir y revertir algunas de las lesiones ocasionadas por los procesos de congelación y descongelación en los espermatozoides, ocasionando una mejora en sus parámetros de calidad (Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pé *et al.*, 2001; Maxwell *et al.*, 2007; Colas *et al.*, 2009), a través de la disminución de los eventos relacionados con la criocapacitación (Maxwell *et al.*, 1998; Pérez-Pé *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Vadnais *et al.*, 2007). Además, se ha observado que la adición de PS mejoró las tasas de fertilidad luego de la IA tanto en ovinos (Maxwell *et al.*, 1999) como en equinos (Alghambi *et al.*, 2004). Las responsables de estos efectos serían un grupo o fracción de proteínas que tienen la capacidad de adherirse a las membranas espermáticas (PPSiE) (Barrios *et al.*, 2005; Bernardini *et al.*, 2011).

Contrariamente, también se han reportado efectos nocivos del PS sobre la movilidad (De Lamirande; Cagnon, 1984; Morrier *et al.*, 2003), la viabilidad (Dott *et al.*, 1979) y la supervivencia espermática luego de la criopreservación (O' Meara *et al.*, 2007). En tal sentido, Pursel y Johnson (1975) recomendaron remover el PS previamente a la congelación de semen de cerdo ya que podría afectar negativamente la supervivencia de los espermatozoides luego de la descongelación. En equinos la remoción del PS y su resuspensión en un medio artificial han sido utilizados para mejorar la supervivencia e integridad del ADN en espermatozoides criopreservados (Love *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2005). En estudios realizados en ovinos se observó que la adición de PS al semen congelado/descongelado no mejoró las tasas de preñez luego de la IA por vía cervical (O' Meara *et al.*, 2007). En el caso particular del caprino, se observó un efecto negativo del PS cuando el semen fue congelado/descongelado en medios compuestos por yema de huevo y leche. Para explicar lo anterior, se determinó que las enzimas fosfolipasas presentes en el PS interactúan con la lecitina

de la yema de huevo y producen sustancias tóxicas para los espermatozoides. Pero esta es una situación muy particular del semen de macho cabrío que no parece tener equivalente en otras especies. La variabilidad en la composición del PS hace que su efecto sobre espermatozoides refrigerados o congelados sea diferente. Una explicación posible para esta variabilidad podría ser la presencia o ausencia de determinados componentes, así como la variación existente en su concentración, más probablemente en el caso de las proteínas (Fournier-Delpech; Thibault, 1993; Peña *et al.*, 2006).

En resumen, es claro que el PS tiene la capacidad de revertir/revertir parcialmente los daños ocasionados por la criopreservación y que esta capacidad estaría dada por la fracción de proteínas del PS que se adhieren al espermatozoide (PPSiE). Teniendo en cuenta que la PPSiE se compone principalmente de proteínas de bajo peso molecular con dominios de fibronectina tipo II, hipotetizamos que, dadas las funciones descritas anteriormente para este dominio, sería el responsable de la actividad crioprotectora. Por otro lado, ya que la obtención de proteínas crioprotectoras a partir del PS es limitada, particularmente durante la estación no reproductiva, la disponibilidad de estas a través del clonado y la expresión *in vitro* como proteínas recombinantes podría ser útil para la formulación de medios de descongelación de espermatozoides ovinos. Así, el agregado de estas al momento de la descongelación podría revertir los daños ocasionados por la exposición a bajas temperaturas, mejorando las tasas de fecundación obtenidas con semen refrigerado o congelado.

### **Hipótesis de trabajo**

---

- Los espermatozoides obtenidos mediante electroestimulación presentan mayor resistencia a los daños ocasionados por la criopreservación
  
- Esta mayor resistencia estaría dada por la elevada concentración relativa de proteínas de bajo peso molecular presentes en el plasma seminal
  
- El agregado de proteínas de bajo peso molecular en el medio de congelación/descongelación mejora la calidad y capacidad fecundante de los espermatozoides ovinos congelados/descongelados

### **Objetivo general**

---

Mejorar la calidad y capacidad fecundante del semen ovino congelado/descongelado

## **Capítulo II.**

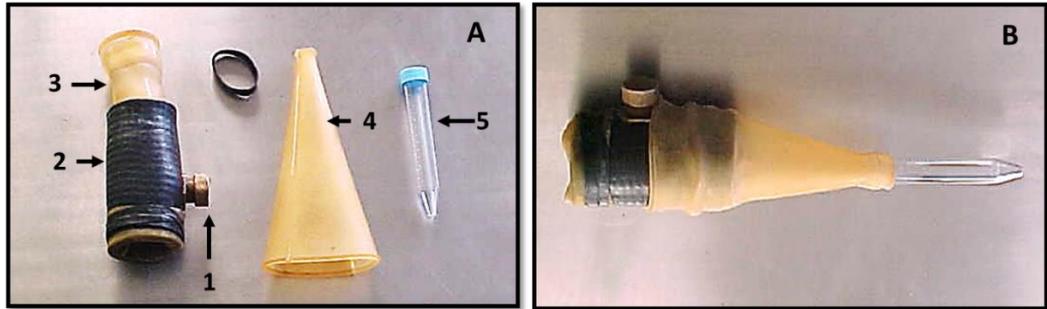
# **Influencia del método de colecta sobre la calidad seminal y la respuesta de los espermatozoides a la criopreservación**

## 2.1. INTRODUCCIÓN

### Métodos de colecta seminal

La recolección del semen constituye la base preliminar de la IA y el problema tecnológico más complejo y delicado, por múltiples razones. Debido a ello, ha sido objeto de constantes estudios, con el fin de asegurar el desarrollo de métodos cada vez más adecuados y de asegurar la obtención de la masa total del eyaculado sin alterar sus condiciones de pureza e integridad, así como sus propiedades biológicas, sin crearle perjuicios de ningún tipo al reproductor.

Son varios los métodos que se han ideado para la recolección de semen, dentro de los más comúnmente utilizados y estudiados se encuentran la vagina artificial (VA) y el electroeyaculador (EE). Ambos tienen ventajas como desventajas. La VA consiste en un tubo cilíndrico de goma, recubierto internamente por una camisa de látex unida a un cono, de látex también, al cual se le conecta un tubo colector en donde se vuelca la muestra de semen. El espacio comprendido entre el tubo de goma y la camisa se completa con agua caliente (42 °C aprox.), generando presión y temperatura en el pene del animal (figura 3). Este es un método que se asemeja al servicio natural y de fácil aplicación que trata de imitar las condiciones fisiológicas del animal. Se aplica como estimulantes el calor y la presión, imitando las condiciones vaginales de la hembra. Como desventajas, se pueden mencionar que requiere de un período previo de entrenamiento de los animales que puede variar desde pocos días a varios meses según el reproductor (Terrill, 1940) y, por otro lado, al depender de la acción voluntaria del animal en algunos casos, por falta de libido o lesiones del tren posterior podemos no obtener un eyaculado.

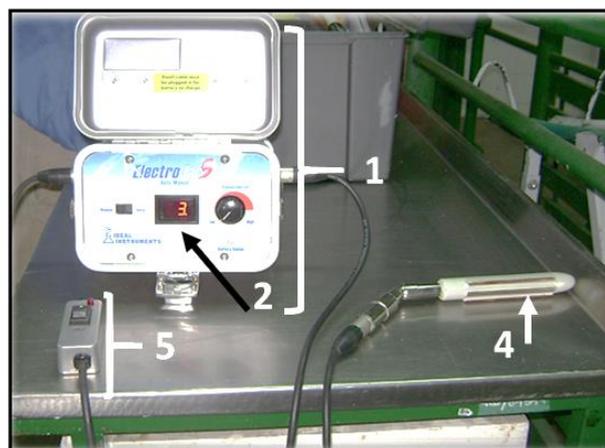


**Figura 3. Vagina artificial utilizada para las colectas seminales.** A: Vagina artificial sin armar. 1: entrada de agua caliente; 2: cubierta exterior; 3: camisa de látex; 4: cono de látex; 5: tubo colector. B: Vagina artificial armada.

La electroeyaculación es un procedimiento parafisiológico que consiste en utilizar estímulos eléctricos similares a los que envía el cerebro a las glándulas sexuales accesorias y al pene, con lo que se logra una erección y una eyaculación. La electroeyaculación se realiza utilizando un dispositivo llamado electroeyaculador (EE) que se introduce en el recto del macho y envía unos choques eléctricos leves y oscilantes al sistema reproductivo para obtener el semen. El EE consiste en una fuente de energía conectada a una sonda que cuenta con 3 electrodos. La sonda se introduce en el recto del animal con sus electrodos orientados hacia la región ventral. Los pulsos de voltaje creciente estimulan los centros nerviosos responsables tanto de la erección como de la eyaculación (como son diferentes nervios, es posible obtener una eyaculación sin erección y viceversa). Este sistema tiene dos modos de funcionamiento, el modo manual y el automático. En el modo manual, la intensidad de los pulsos se controla ajustando el control manual de modo que la tensión continua se aplica a los electrodos de la sonda. En el modo automático, el circuito ofrece una serie de 32 ciclos, con cada ciclo de entrega de una intensidad ligeramente superior (figura 4).

La EE permite la colecta de semen de un mayor número de animales en poco tiempo y al independizarnos de la voluntad del animal para realizar la monta, resuelve las desventajas mencionadas para la VA (Foote, 2002). La EE es una alternativa cuando los machos no pueden ser entrenados para la colecta con VA o en animales silvestres, siendo un método viable para recoger repetidamente semen del mismo macho (Santiago-Moreno *et al.*, 2009). Por otro lado, también presenta desventajas como la necesidad de un operario con experiencia. Tampoco es conveniente coleccionar semen de animales de baja libido ya que esta condición puede ser heredada por su progenie. La otra desventaja es que si no se realiza correctamente el semen puede

contaminarse al eyacular dentro del prepucio. La EE al ejercer su acción estimulante directamente sobre los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos y sobre las glándulas anexas del aparato reproductor, incrementa la proporción PS y reduce, a su vez, la concentración espermática del eyaculado (Austin *et al.*, 1961; Hulet *et al.*, 1964). Sin embargo, observaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo mostraron que tanto el volumen como la concentración de los eyaculados obtenidos con EE pueden ser controlados mediante ajustes en la duración, la intensidad del estímulo y la colecta selectiva de las fracciones del eyaculado (PS y espermatozoides) (Ledesma y col., 2012). Es decir que, un buen ajuste del método (tiempo de estimulación-relajación y momento de obtención) según el individuo, permite obtener eyaculados cuantitativamente similares a los obtenidos con VA.



**Figura 4. Electroeyaculador utilizado para las colectas seminales.** 1: fuente de energía; 2: indicador de ciclos; 3: sonda transrectal; 5: control remoto.

Diversos autores han estudiado la influencia del método de colecta en la calidad de los eyaculados obtenidos, con resultados a favor y en contra de ambas metodologías (Brady; Gildow 1939; Terrill, 1940; Dziuk *et al.*, 1954; Mattner; Voglmayr, 1962; Hulet *et al.*, 1964; Quinn, White, 1966; Lightfoot; Salamon, 1970; Quinn *et al.*, 1968; Pineda *et al.*, 1987; Pineda; Dooley, 1991). Se ha observado incluso, que el método de colecta puede afectar la respuesta espermática a diferentes procedimientos como la criopreservación (Quinn *et al.*, 1968; Marco-Jiménez *et al.*, 1995; Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012).

### **Influencia del plasma seminal en la supervivencia espermática**

Ashworth *et al.* (1994) y Maxwell *et al.* (1997), entre otros, demostraron que el PS constituye un ambiente benéfico para los espermatozoides y que cumple un papel muy importante en el mantenimiento de la viabilidad y de la movilidad espermática en bovinos (Baas *et al.*, 1983) y ovinos (Graham, 1994). El efecto favorable del PS quedó demostrado cuando se comprobó que la viabilidad espermática disminuía si se reducía el volumen de PS por dilución o lavado (Blackshaw, 1953; White, 1953). También fue observado que cambios en la composición del PS luego de remover las glándulas sexuales accesorias resultaron perjudiciales para la fertilidad en ratas (Pursel; Johnson, 1975), ratones (Pang *et al.*, 1979) y hámsters (Chowet *et al.*, 1986).

Sobre esta línea de investigación, surgieron muchos experimentos en los cuales el PS fue agregado a los espermatozoides previamente a su congelación o posteriormente en el medio de descongelación. Así, Ashworth *et al.* (1994) notaron que la movilidad espermática mejoraba cuando el medio de descongelación era suplementado con 10% de PS homólogo. Por su parte, Ollero *et al.* (1997) demostraron que los efectos benéficos del PS sobre los espermatozoides se mantenían aún luego de que el PS fuera removido. También ha sido evaluado el efecto de la adición de 20% de PS a los espermatozoides ovinos luego de la descongelación. En tal sentido, Domínguez *et al.* (2008) observaron mayores porcentajes de espermatozoides móviles y Maxwell y Johnson (1999) observaron mayores porcentajes de espermatozoides con membranas acrosomales íntegras, mayor penetración a través del moco cervical y superiores porcentajes de preñez en ovejas tras una IA cervical. Resultados afines en cuanto a movilidad y estado de las membranas acrosomales fueron informados por Mortimer y Maxwell (2004) al incubar células espermáticas criopreservadas en un medio de composición similar al PS.

Trabajos realizados en el campo de la criopreservación seminal en diferentes especies como cerdos, ovinos, bovinos y ciervos se han enfocado en el rol del PS sobre la estabilización de las membranas espermáticas, así como en la identificación y aislamiento de factores decapacitantes (Guraya, 2000). Es así que en los últimos 20 años muchos estudios se han orientado en la caracterización de fracciones proteicas, que poseen la capacidad de adherirse a las membranas de los espermatozoides capacitados y modificar sus características funcionales, frenando e incluso revirtiendo este estado. Por lo cual, las células retornarían a una condición de pre-capacitación (García-López *et al.*, 1996; Ollero *et al.*, 1997; Barrios *et al.*, 2000). Estas fracciones

fueron capaces de restituir la impermeabilidad de las membranas espermáticas cuando fueron incluidas en el medio, previo a la exposición de los espermatozoides al frío (Pérez-Pé *et al.*, 2001), también provocaron este efecto cuando fueron añadidas luego del daño térmico (Ollero *et al.*, 1997). Pérez-Pé *et al.* (2001) determinaron que el efecto crioprotector de las proteínas del PS es concentración dependiente. Luego del agregado de 2,1 mg de proteínas provenientes de PS a espermatozoides sometidos a *cold-shock* observaron un mayor porcentaje de células viables y disminución del porcentaje de células capacitadas. Demostrando que esta capacidad de las proteínas del PS de revertir los daños ocasionados por la criopreservación es concentración-dependiente.

Ollero *et al.* (1997) observaron un incremento significativo de la movilidad espermática en muestras seminal de ovino incubadas con la fracción de proteínas >10 kDa antes de exponerlos a bajas temperaturas, y aumentos significativos en la proporción de células con membranas plasmática y acrosomal íntegras luego de su descongelación. Estudios en la especie ovina demostraron que el máximo porcentaje de restauración (65%) de la MP de espermatozoides expuestos a choque térmico se conseguía luego de la incubación con 1,4 mg de proteínas del PS (Barrios *et al.*, 2000). Domínguez *et al.* (2008), en un estudio llevado adelante en nuestro laboratorio, determinaron que la composición proteica del PS difiere según la estación del año, siendo el PS colectado en otoño el que posee la mayor capacidad de revertir los daños antes mencionados, en coincidencia con lo reportado por Cardozo *et al.* (2006). Este efecto fue relacionado tanto a la presencia de una mayor concentración de proteínas totales en el PS, como a una diferencia en su perfil proteico.

Barrios *et al.* (2000) y Pérez-Pé *et al.* (2001) hallaron en el PS dos proteínas de bajo peso molecular (14 y 20 kD) denominadas por su origen y peso como RSVP-14 y RSVP-20 (de sus siglas en inglés *ram seminal vesicle proteins*), las cuales serían las principales responsables de proteger a los espermatozoides de los daños ocasionados por la criopreservación, así como de preservar la integridad de las membranas plasmáticas. Aunque no se ha confirmado su mecanismo de acción, se hipotetiza que estas ejercerían su efecto a través de la inhibición y reversión del estado de capacitación espermática.

En este capítulo nos planteamos comparar los eyaculados obtenidos con los métodos de colecta seminal más difundidos en la especie ovina y la respuesta de los mismos a la criopreservación e hipotetizamos que las características del PS que compone cada tipo de eyaculado condiciona esta respuesta.

**Objetivos particulares de este capítulo**

- Describir y comparar los eyaculados de carnero obtenidos con vagina artificial y electroeyaculador.
- Caracterizar y comparar los componentes de naturaleza proteica presentes en el plasma seminal obtenido con vagina artificial y electroeyaculador

## 2.2. MATERIALES y MÉTODOS

### 2.2.1. Lugar y período experimental

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Grupo de Biotecnología de la Reproducción de la EEA INTA Balcarce ubicadas en el kilómetro 73,5 de la ruta nacional 226, partido de Balcarce en la provincia de Buenos Aires, Argentina (37° 45' latitud sur, 58° 18' longitud oeste, a 130 metros sobre el nivel del mar). Todos los animales utilizados en este estudio fueron manejados en estricta conformidad con las buenas prácticas de manejo aprobadas por el Comité de Ética Animal de la EEA. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal.

### 2.2.2. Obtención y procesamiento de los eyaculados

Se trabajó con los eyaculados pertenecientes a cinco carneros adultos (> 5 años) de la raza *Corriedale*, en buena condición corporal y estado sanitario. Se los mantuvo en una pastura a base de raygras (*Lolium perenne*), festuca (*Festuca arundinacea*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), suplementados con rollo de pastura durante los meses de invierno y acceso *ad libitum* al agua de bebida.

Las colectas seminales se realizaron una vez a la semana con VA y otra vez con EE de manera alternada, desde el mes de marzo hasta junio de 2013 (12 semanas). Se obtuvieron 12 pools de eyaculados con VA y 12 con EE, los primeros seis pools de cada método fueron utilizados para la evaluación de la calidad seminal en estado fresco y luego de la congelación/descongelación y los últimos seis pools obtenidos con cada método fueron utilizados para la obtención de PS (figura 1). Los machos se sometieron a un período de abstinencia de dos días entre colectas teniendo en cuenta los resultados positivos sobre la viabilidad de los espermatozoides del carnero en relación con el periodo de abstinencia y las sucesivas eyaculaciones encontradas por Ollero *et al.* (1996).

Debido a que en el ovino el potencial fecundante del semen no permanece constante a lo largo del año, se eligió trabajar con semen obtenido en otoño, estación en la cual se minimizan las diferencias en cuanto a la morfología y la capacidad fecundante de los espermatozoides entre los distintos animales (Colas, 1983).

## **Vagina artificial**

Uno de los métodos utilizados para la colecta de semen fue la vagina artificial (VA), atemperada en estufa a 42 °C. Se utilizaron carneros entrenados previamente para la extracción con esta metodología y se los estimuló mediante la presencia de ovejas ovariectomizadas, sin tratamiento hormonal. Las muestras fueron obtenidas luego de realizar una falsa monta y siempre se utilizó el segundo eyaculado de cada carnero.

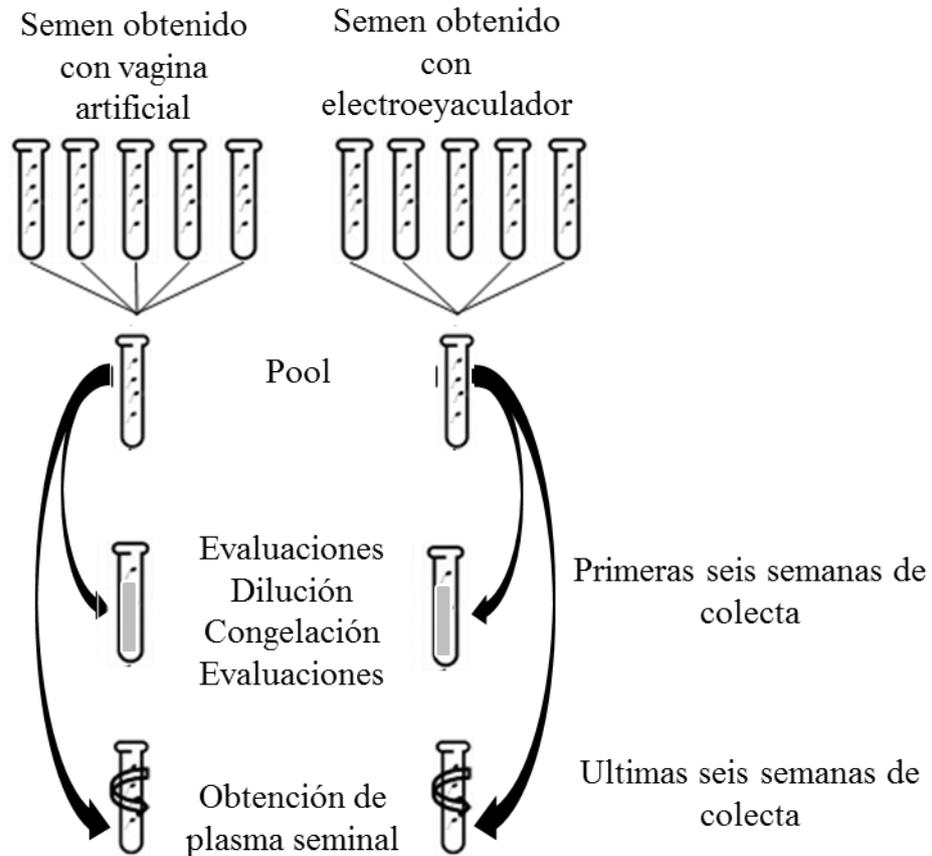
## **Electroeyaculador**

Para la obtención de semen con EE se utilizó un equipo ElectroJac 5, con una sonda rectal de 22 cm de largo x 2,5 cm de diámetro y 3 electrodos longitudinales. Previo a la electroeyaculación (15 minutos), los animales recibieron una inyección intramuscular de clorhidrato de xilacina (0,2 mg/Kg, Xylacina 2%, Alfasan, Argentina) y se procedió a higienizar el área prepucial. Para realizar esta maniobra, los animales fueron colocados en decúbito lateral izquierdo y se les introdujo la sonda lubricada con gel en el recto, posicionando los electrodos ventralmente. El EE fue utilizado en modo automático, permitiendo un incremento gradual del voltaje hasta provocar la eyaculación. El pene fue exteriorizado y fijado en esa posición de manera manual con una gasa estéril. El semen fue colectado en un tubo graduado, similar al utilizado para la colecta con VA. Posteriormente, el tubo con el semen recién extraído fue transferido al laboratorio y colocado en Baño de María (BM) a 35 °C hasta la evaluación cuali-cuantitativa de los parámetros espermáticos. Luego de la extracción, los animales se recuperaron rápidamente y se les administró una ración de grano de maíz.

Para la obtención de PS los pools de eyaculados obtenidos de cinco carneros con VA y EE fueron centrifugados dos veces (2000 x g durante 15 min a 4 °C) y el sobrenadante fue recuperado, filtrado (0,22 µm) y conservado a -80 °C hasta el momento de realizar las evaluaciones. El volumen de PS fue determinado en tubos de plástico graduados.

### **2.2.3. Congelación y descongelación de semen**

El semen fue diluido en diluyente de congelación compuesto por TRIS-[hidrymetil] aminometano (360 mM), glucosa (33,3 mM), ácido cítrico (113,7 mM), penicilina ( $1 \times 10^6$  UI/l), estreptomicina (1g/l), glicerol (7% v/v) y yema de huevo (10%) (Maxwell, 1986) a 35 °C. Una vez diluida, la muestra se mantuvo a temperatura ambiente hasta alcanzar los 20 °C, para finalmente ser enfriada hasta los 5 °C (en heladera) a una tasa de enfriamiento de 0,5 °C/min. Posteriormente, el semen diluido y enfriado a 5 °C se equilibró durante 2 hs. Las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0,25 ml, con una concentración de 100 millones de espermatozoides. Para su congelación, las pajuelas fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido (-100°C) durante 10 minutos y posteriormente volcadas en el nitrógeno y se conservaron en termos con nitrógeno líquido (-196 °C) hasta su procesamiento. La descongelación se realizó por inmersión de las pajuelas en BM a 37 °C, durante 1 minuto. Posteriormente su contenido fue vertido en un tubo de vidrio atemperado en el mismo baño.



**Figura 5.** Esquema del diseño experimental adoptado para la colecta de semen y de plasma seminal para su posterior análisis y criopreservación.

#### 2.2.4. Evaluaciones cuali-cuantitativas realizadas sobre los espermatozoides

##### 2.2.4.1. Volumen y concentración del eyaculado

La determinación del volumen se efectuó mediante la observación directa de la graduación marcada en el tubo de colecta con una precisión de 0,1 ml.

La concentración espermática se determinó mediante la medición de la absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Accured (IMV Technologies, Francia). La tasa de dilución utilizada fue la indicada para las especies ovina/caprina (1/400).

#### **2.2.4.2. Movilidad masal microscópica**

En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la movilidad masal, definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Normalmente la movilidad masal se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas. Tras la dilución del eyaculado fresco, o tras la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento.

Para esta determinación se descargó una alícuota de 5 µl del eyaculado sobre un portaobjetos colocado sobre una platina térmica a 37 °C. Se utilizó un microscopio óptico con un aumento de 40x y se evaluó la zona ubicada en el borde de la gota.

#### **2.2.4.3. Movilidad total y rectilínea progresiva**

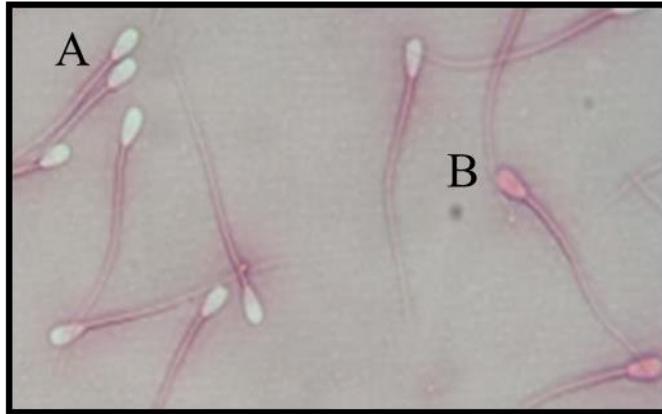
Para la determinación subjetiva de estos dos parámetros se colocó una alícuota de 5 µl de semen entre porta y cubreobjetos sobre una platina térmica a 37 °C y mediante la observación de al menos 2 campos microscópicos, utilizando un microscopio óptico (40x) se visualizó y estimó subjetivamente la proporción (%) de espermatozoides móviles totales y de espermatozoides móviles con desplazamiento de avance rectilíneo.

#### **2.2.4.4. Integridad de la membrana plasmática**

Las muestras de semen fueron coloreadas con eosina y nigrosina, según una modificación del método descrito por Mortimer (1994). El protocolo de coloración fue el siguiente: se colocó una alícuota de 6 µl de la muestra sobre un portaobjetos y al lado de ésta, una alícuota (10 µl) de la solución de eosina-nigrosina (0,67% eosina, 10% nigrosina). Ambas gotas fueron mezcladas y debidamente homogeneizadas durante 10 segundos para posteriormente efectuar un frotis que fue secado sobre platina térmica a 37 °C. Los espermatozoides total o parcialmente coloreados (rosado-violeta) fueron considerados como células con alteraciones de membrana, mientras

que aquellos que no se tiñeron (blanco) fueron considerados como células con la membrana plasmática intacta.

Se contaron 200 células en un microscopio óptico (40x) y se calculó el porcentaje de los espermatozoides sin alteraciones de la membrana plasmática (figura 6).



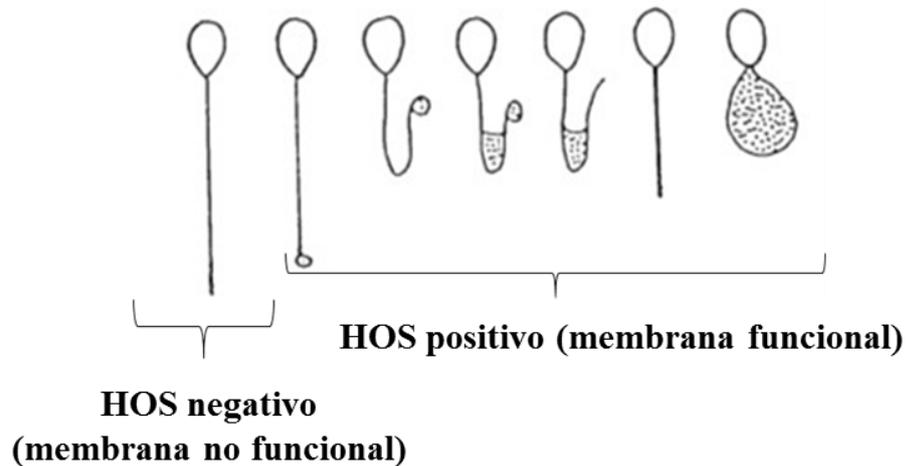
**Figura 6. Espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina, representando integridad de la membrana plasmática. A: membrana plasmática intacta y B: membrana plasmática alterada.**

#### 2.2.4.5. Funcionalidad de la membrana plasmática

Esta metodología se denomina prueba hipoosmótica (HOS: Hypoosmotic Sweeling Test) que se basa en el aumento de volumen que experimentan las células espermáticas con membrana plasmática del compartimiento flagelar intacta cuando son sometidas a un choque osmótico al incubar la muestra en un medio hipotónico. De este modo, la disminución de la relación entre superficie y volumen provoca el enrollamiento del flagelo del espermatozoide.

Se utilizó un método descrito por Jeyedran *et al.* (1984) para la especie humana, adaptado al estudio de semen de ovino por García Artiga (1994) como se describe a continuación: se incubó en BM a 37 °C, durante 30 min, una alícuota de 20 µl de semen en 500 µl de un medio hipoosmótico (citrato de sodio/glucosa 100 mOsm/l). Transcurrido ese tiempo, se agregaron 50 µl de una solución HOS stop (citrato de sodio/glucosa 100 mOsm/l, 3% formaldehído) para detener la reacción. Para su evaluación se colocó una gota (6 µl) entre porta y cubreobjetos, y se cuantificó microscópicamente (40x) el porcentaje de células positivas (espermatozoides con

flagelo enrollado = HOS +) sobre un total de 200 células. Se consideraron negativos los casos en que el flagelo se mostró recto o en forma de látigo (figura 7).



**Figura 7. Espermatozoides sometidos a la prueba HOS, representando funcionalidad de la membrana plasmática.** Espermatozoide HOS negativo (membrana plasmática no funcional) y espermatozoides HOS positivo (membrana plasmática funcional).

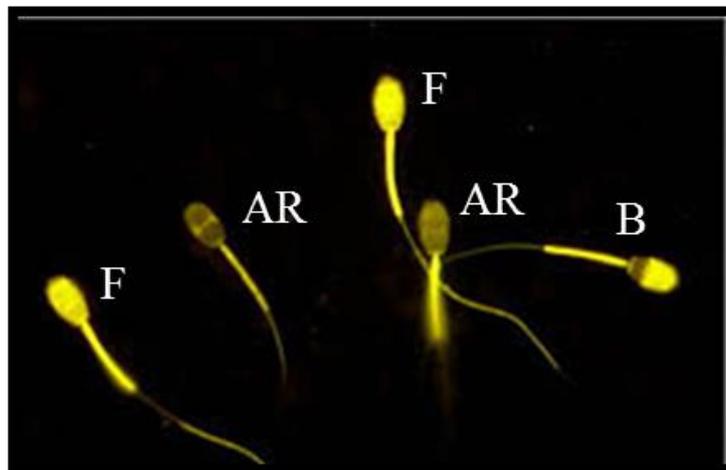
#### 2.2.4.6. Estado del acrosoma

La prueba de la Clortetraciclina se basa en la propiedad de unión de este antibiótico (Clortetraciclina) al calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) de membrana. La distribución del  $\text{Ca}^{++}$  en el acrosoma sufre cambios durante el proceso de capacitación espermática, los cuales pueden ser evidenciados mediante esta prueba. De este modo, es posible diferenciar el estado de capacitación del comienzo de la reacción acrosómica (Fraser, 1995).

Para realizar esta determinación se siguió el protocolo descrito por Pérez *et al.* (1996). Brevemente, una alícuota (750  $\mu\text{M}$ ) de clortetraciclina (CTC) se diluyó en 2 ml de una solución CTC-buffer (20 mM Tris, 130 mM NaCl, 5 mM cisteína, pH 7,8). Esta mezcla luego fue filtrada a través de una membrana de acetato de celulosa (Microclar) de 0,22  $\mu\text{m}$  con el propósito de que no quedaran partículas en la suspensión y se mantuvo a 4 °C, hasta el momento de ser utilizada. En un tubo se colocó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de la muestra de espermatozoides y se le añadieron 20  $\mu\text{l}$  de la solución CTC-buffer. Ambos se homogeneizaron durante 20 segundos, al resguardo de la luz. La reacción colorimétrica fue detenida mediante la adición de 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla de partes iguales de dos soluciones fijadoras: A (Tris-HCL 1 M + 1%

(v/v) glutaraldehído EM (25%) + 5 ml de agua bidestilada estéril) y B (Tris 1 M + 1% (v/v) glutaraldehído EM (25%) + 10 ml de agua bidestilada estéril), pH 7,8. Se colocaron 5 µl de la muestra fijada entre porta y cubreobjetos y se evaluó el estado de capacitación utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse TE-300 Japón) a 40x. El colorante fue excitado con luz ultravioleta y se utilizó un filtro barrera de amplio rango (LP) (380 nm de excitación y 420 nm de emisión). Se contaron 200 espermatozoides y fueron clasificados de acuerdo a los patrones-CTC descritos por Fraser (1995):

- Patrón F-CTC: espermatozoides no capacitados, fluorescencia uniformemente distribuida en toda la cabeza con una banda brillante en la región ecuatorial.
- Patrón B-CTC: espermatozoides que han iniciado el proceso de capacitación; fluorescencia uniforme, aunque menos intensa que la anterior y pérdida de la banda ecuatorial o fluorescencia en la parte anterior de la cabeza sin fluorescencia en la región posacrosomal.
- Patrón AR-CTC: espermatozoides con reacción acrosómica, no se observa ninguna fluorescencia sobre la cabeza o sólo una delgada banda fluorescente en el segmento ecuatorial (figura 8)



**Figura 8. Espermatozoides expuestos a la prueba de la clortetraciclina, representando el estado de capacitación.** Clasificación de los patrones-CTC según el estado del acrosoma. F: no capacitado; B: capacitado y AR: reaccionado.

## 2.2.5. Determinaciones realizadas en el plasma seminal

### 2.2.5.1. Concentración de proteína total

Se evaluaron tres muestras de PS obtenidas con VA y tres muestras de PS obtenidas con EE, elegidas al azar. La determinación de la concentración de proteína total se realizó mediante el método de Bradford (1976), utilizando una curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA). Luego de 10 min de incubación de las muestras con el reactivo de Bradford se realizaron las lecturas de absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (Genequant1300, Alemania).

#### **2.2.5.2. Electroforesis en una dimensión**

Para la separación de proteínas presentes en el PS obtenido con EE y con VA se realizó electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según el método descrito por Schagger y Von Jagow (1987). Las muestras de proteína (15 µg) fueron mezcladas con buffer de siembra conteniendo 12 mM Tris-HCl pH 6,2, 5% (v/v) glicerol, 0,4% (p/v) SDS y 0,02% (p/v) azul de bromofenol y 100 mM ditiotreitól, hervidas durante 5 min y separadas por electroforesis en un gel de 12% (p/v) acrilamida. Se utilizó un marcador de peso molecular del rango de 12-225 kDa (RPN 800, Amersham Biosciences, EE.UU.). La corrida electroforética se realizó a 20 mA durante un período de aproximadamente 1 h. Para la visualización de las proteínas los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-350 (Amersham Biosciences, EE.UU.). Posteriormente los geles fueron desteñidos mediante lavados con agua destilada y escaneados. El análisis de las proporciones relativas de cada banda proteica presente en el PS obtenido con ambos métodos de colecta seminal se realizó por medio del software IMAGEJ 1.43 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>).

#### **2.2.5.3. Electroforesis en dos dimensiones**

Esta técnica separa a las proteínas según dos criterios: peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI). Para realizar la electroforesis en dos dimensiones se escogieron al azar tres muestras de PS colectado con VA y tres muestras de PS colectado con EE. La electroforesis se llevó a cabo de la siguiente manera: una alícuota conteniendo 100 µg de proteínas precipitadas con acetona fueron diluidas en

125 µl de buffer de rehidratación (8 M urea, 2% [3-(3-(cholamidopropyl) dimethylammonio)-1 propane sulphomate] (CHAPS), 40 mM dithiothreitol (DTT), 0,5% IPG buffer 3–10 NL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) y 0,002% de bromophenol blue. La rehidratación pasiva se realizó en tiras de 7 cm, con gradientes no lineales de pH 3-10 (IPGs GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Las tiras se colocaron durante 16 h en el canal de rehidratación con la solución descrita anteriormente. El isoelectroenfoque fue realizado utilizando un Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (GE Healthcare). El equipo fue programado de la siguiente manera: 300 V a 200 Vh (steady-state level), 1000 V 300 Vh (gradiente), 5000 V 4500 Vh (gradiente) y 5000 V 2000 Vh (steady-state level). Una vez finalizada la corrida en primera dimensión las tiras fueron incubadas durante 15 min en agitación suave con buffer de equilibrio (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, bromophenol blue) con 1% (w/v) DTT, luego volvieron a incubarse por otros 15 min en el mismo buffer conteniendo 2.5% (w/v) iodoacetamida. La separación de proteínas en la segunda dimensión fue realizada en geles de 12% de poliacrilamida como fue descrito en el punto anterior.

Los geles bi-dimensionales fueron escaneados a 300 dpi y analizados utilizando el software PD-Quest (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Con los mapas bidimensionales obtenidos de las tres muestras de PS colectado con VA y EE se generó una imagen representativa denominada master gel por método de colecta. Se utilizaron marcas para relacionar y comparar los puntos o spots presentes en cada master gel. Se comparó la densidad de estos spots (concentración de proteínas) y fueron reportadas como parte por millón sobre el total de la densidad óptica integrada de acuerdo al software PD-Quest.

#### **2.2.5.4. Identificación de las proteínas**

Las bandas y spots correspondientes a las proteínas de interés fueron recortados de los geles de una y dos dimensiones, respectivamente, y fueron enviados al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI-TOF CEQUIBIEM (Universidad de Buenos Aires, Argentina). Luego fueron sometidos a una digestión trípica para obtener su huella peptídica mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF. Se utilizó un espectrómetro de masas con fuente de ionización

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) y analizador tipo tiempo de vuelo (TOF). Las secuencias resultantes fueron contrastadas con la base de datos de acceso libre del National Centre of Biotechnological Information (NCBI), utilizando la herramienta de búsqueda Mascot MS/MS ion (versión 2.1; [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Para la interpretación final de los resultados obtenidos en las búsquedas en las bases de datos, el programa utilizó el algoritmo MOWSE, en base a la cantidad y abundancia relativa de los péptidos identificados, obteniéndose la probabilidad asociada a cada una de las proteínas identificadas (MOWSE Score). En los casos en que la identificación de las proteínas se basó en un solo péptido, se tomó un score mínimo de 50.

#### **2.2.6. Análisis estadístico de los datos**

Todos los datos fueron evaluados para la distribución de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza utilizando el procedimiento de modelos lineales generales del paquete estadístico SAS (SAS 2000). Los parámetros espermáticos se analizaron mediante ANOVA. El modelo estadístico incluyó los efectos del método de colecta, la semana y su interacción. Para evaluar la composición proteica del PS, se realizaron tres experimentos y se analizó una imagen representativa. Los valores de intensidad para cada banda se normalizaron a la proteína total dentro de cada calle, y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba T-Student para datos no apareados (dos colas). Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron con  $p \leq 0,05$ .

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Evaluaciones cuali-cuantitativas realizadas sobre los eyaculados en estado fresco y luego de la congelación/descongelación

Inicialmente se determinó el volumen de los eyaculados y la proporción entre células espermáticas y PS de los mismos. Los eyaculados obtenidos con EE presentaron mayor volumen que los obtenidos con VA y la relación espermatozoides/PS para los eyaculados obtenidos con VA fue mayor que para los obtenidos con EE (tabla 1) evidenciando que el mayor volumen obtenido por medio de EE corresponde a PS. Consistentemente, la concentración de espermatozoides/ml de semen, fue mayor en los eyaculados obtenidos mediante VA en comparación con EE (tabla 1).

Las movilidades (total y progresiva) y el porcentaje de células con membrana plasmática intacta del semen fresco fueron mayores en los eyaculados obtenidos mediante EE en comparación con los obtenidos por VA. No detectamos diferencias en el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional entre ambos métodos de colecta (tabla 1).

En cuanto a la calidad de los eyaculados obtenidos con VA y EE luego de su congelación/descongelación, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células con membrana plasmática intacta, simultáneamente con una disminución en el porcentaje de células que perdieron el acrosoma en los eyaculados colectados por EE (tabla 2). Sin embargo, para esta misma condición el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fue menor en comparación con los obtenidos por VA (tabla 2).

**Tabla 1.** Parámetros cuali/cuantitativos de muestras seminales de carnero obtenidas con vagina artificial (VA) y electroeyaculación (EE).

Parámetro	VA	EE
<b>Movilidad total (%)</b>	47,0 ± 4,5 <sup>a</sup>	67,5 ± 4,5 <sup>b</sup>
<b>Movilidad progresiva (%)</b>	51,0 ± 2,7 <sup>a</sup>	78,3 ± 2,7 <sup>b</sup>
<b>Membrana plasmática intacta (%)</b>	43,7 ± 3,7 <sup>a</sup>	69,0 ± 3,7 <sup>b</sup>
<b>Membrana plasmática funcional (%)</b>	54,0 ± 4,5	52,2 ± 4,5
<b>Volumen (µl)</b>	1740,5 ± 474,1 <sup>b</sup>	3999 ± 38,6 <sup>a</sup>
<b>Concentración (espz./ml)</b>	3027,8 ± 711,0 <sup>a</sup>	1564,2 ± 744,0 <sup>b</sup>

Media ± error estándar; letras diferentes (ab) por columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Parámetros cuali/cuantitativos de muestras seminales congeladas/descongeladas de carnero obtenidas con vagina artificial (VA) y electroeyaculación (EE).

Parámetro (%)	VA	EE
<b>Movilidad total</b>	36,6 ± 3,0	35,2 ± 3,0
<b>Movilidad progresiva</b>	31,0 ± 4,0	36,0 ± 4,0
<b>Membrana plasmática intacta</b>	34,7 ± 2,7 <sup>b</sup>	50,0 ± 2,8 <sup>a</sup>
<b>Membrana plasmática funcional</b>	42,0 ± 3,9	26,4 ± 4,2
<b>Patrón CTC-F</b>	33,4 ± 4,0	29,8 ± 4,0
<b>Patrón CTC-B</b>	40,8 ± 2,9	42,3 ± 2,9
<b>Patron CTC-AR</b>	37,2 ± 2,1 <sup>a</sup>	30,6 ± 2,1 <sup>b</sup>

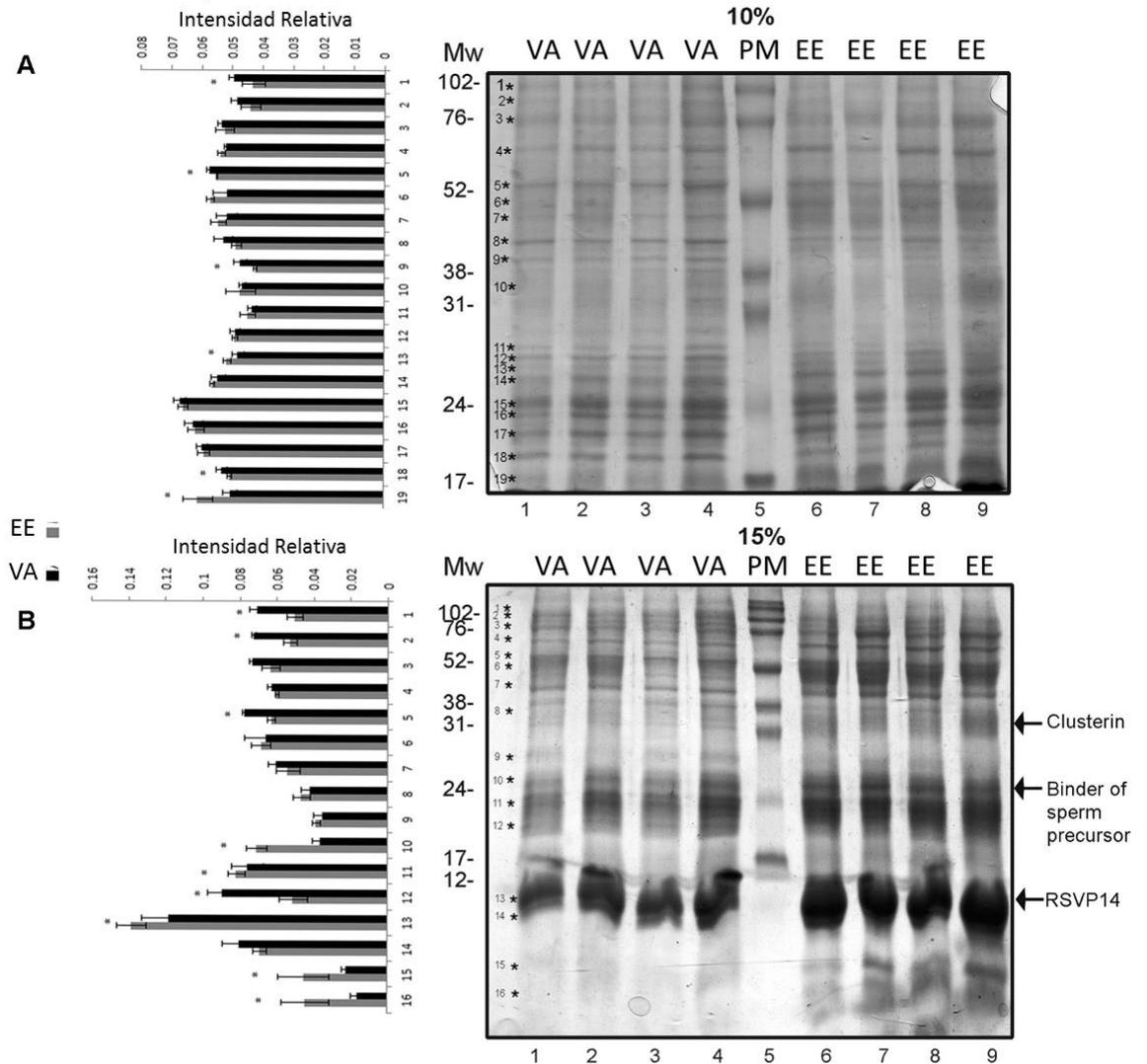
Media ± error estándar; letras diferentes (ab) por columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 2.3.2. Evaluaciones realizadas sobre el plasma seminal

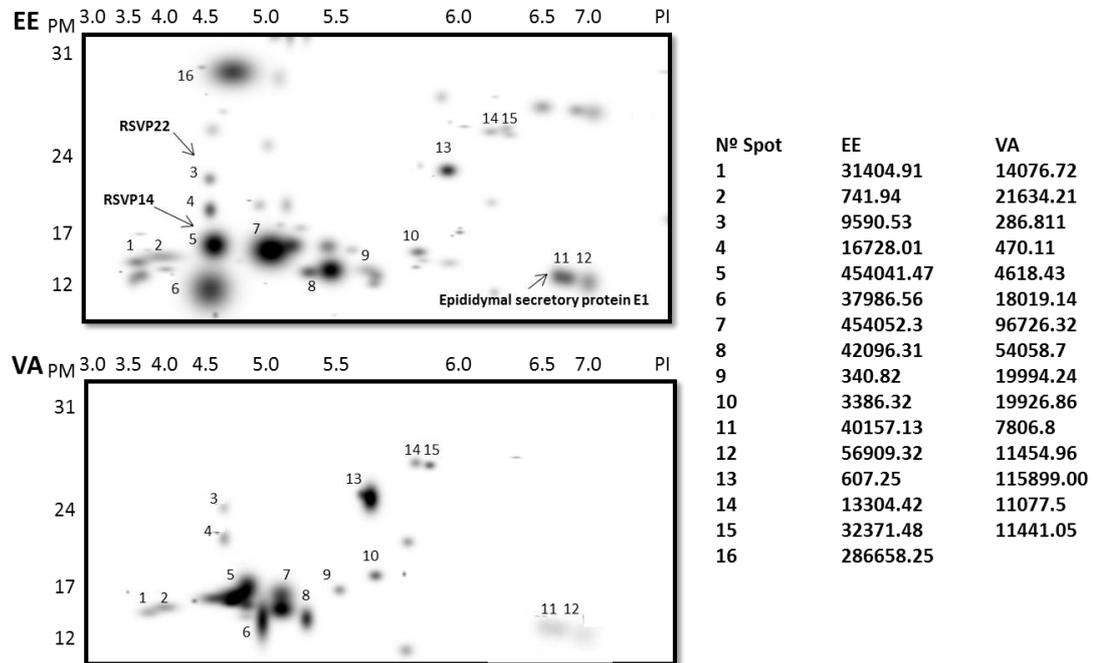
La concentración proteica del PS fue similar entre ambos métodos de colecta ( $66,4 \pm 21,1$  mg/ml y  $48,6 \pm 14,7$  mg/ml, respectivamente para VA y EE). Sin embargo, al ajustar la concentración proteica por el volumen de PS, el contenido proteico total fue significativamente mayor en los eyaculados obtenidos con EE que los obtenidos mediante VA ( $216,3 \pm 56,5$  mg y  $127,1 \pm 55,0$  mg respectivamente). El análisis

cualitativo y posterior densitometría de las proteínas de los PS obtenidos por los dos métodos mostró el mismo patrón electroforético, observándose variaciones en su concentración relativa. El PS obtenido con EE presentó una mayor abundancia relativa de proteínas de bajo peso molecular. Cinco proteínas de bajo peso molecular aproximadamente 25, 23 kDa y tres bandas menores a 12kDa denominadas \*10, \*11, \*13, \*15 y \*16, respectivamente (figura9, panel inferior) estuvieron significativamente aumentadas en el PS colectado con EE. La proteína de aproximadamente 38 kDa, designada como banda \*8, también se encontró aumentada en el PS obtenido con EE con respecto al PS obtenido con VA ( $p = 0,05$ ). Por otro lado, dos bandas proteicas de alto peso molecular, aproximadamente 102 y 52 kDa denominadas \*1 y \*5 (figura9, panel superior) estuvieron aumentadas ( $p < 0,05$ ) en el PS colectado con VA. Tres de las proteínas aumentadas en PS obtenido con EE fueron identificados por huella peptídica como CLUSTERIN, BINDEROFSPERM PRECURSOR y SEMINALVESICLE 14-kDa PROTEINPRECURSOR (RSVP14) (figura 9; tabla 8anexo).

Basándonos en que el PS colectado con EE se encontró enriquecido en proteínas de bajo peso molecular enfocamos el análisis de electroforesis en dos dimensiones en las proteínas comprendidas en el rango 12–31 kDa. Detectamos 15 spots con puntos isoeléctricos (pI) comprendidos en el rango 3,0 y 7,0. Cinco de estos spots se encontraron aumentados en el PS colectado con VA, denominados como \*2, \*8, \*9, \*10y \*13 (figura 10) y 10 spots aumentados en el PS colectado con EE, denominados\*1, \*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*11, \*12, \*14 y \*15 (figura10). Un spot (\*16) de aproximadamente 31 kDa de peso molecular y pI 4,8 fue exclusivamente observado en el PS recuperado con EE. Tres de estos spots fueron identificados por espectrometría de masa como SEMINALVESICLE PROTEINPRECURSOR (RSVP22), EPIDIDYMAL SECRETORY PROTEIN E1 PRECURSOR y SEMINALVESICLE 14-kDa PROTEIN PRECURSOR (RSVP14) (figura10; tabla I anexo).



**Figura 9.** Análisis electroforético en una dimensión de las proteínas que componen el plasma seminal obtenido por electroeyaculador (EE) y vagina artificial (VA). En la parte superior de la figura se resuelven las proteínas de alto peso molecular (SDS-PAGE, 10% acrilamida) y en la parte inferior las de bajo peso molecular (15% acrilamida). A la derecha de la figura se muestran los perfiles proteicos y a la izquierda los resultados de densitometría. Se analizaron cuatro pools de plasma seminal (15 µg/línea) colectados con vagina artificial (VA 1–4) y cuatro con electroeyaculación (EE 1–4). La posición del marcador de peso molecular se indica a la izquierda. La intensidad de cada banda fue normalizada al valor de proteína total dentro de su correspondiente línea. Para determinar las diferencias entre métodos de colecta, el valor promedio  $\pm$  desvío estándar de cada banda fue analizado con T-test (panel izquierdo). Las diferencias significativas se indican por \*. Tres de las proteínas aumentadas en PS colectado con EE fueron identificadas por huella peptídica como se indica a la derecha del gel.



**Figura 10. Análisis electroforético en dos dimensiones de las proteínas de bajo peso molecular que componen el plasma seminal obtenido por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).** Master gels de tres ensayos generados por PD-Quest software (Bio-Rad) y las respectivas intensidades de los spots de proteínas de plasma seminal obtenidas con EE y VA. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda y los indicadores de pI en la parte superior de los gels. Las flechas muestran las proteínas que fueron identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

## 2.4. DISCUSIÓN

Mediante los resultados presentados en este capítulo observamos que el método de colecta seminal influye en la calidad de los eyaculados obtenidos, tanto en estado fresco como luego de la congelación/descongelación. Con una mayor calidad para los eyaculados obtenidos mediante EE, en concordancia con lo reportado por Marco-Jiménez *et al.* (2005).

A nivel de la composición del semen, se observó que los eyaculados colectados con EE tuvieron una mayor proporción de PS, lo que coincide con estudios publicados anteriormente en caprinos y bovinos (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012; Rego *et al.*, 2015). Esta mayor proporción de PS podría explicarse por la sobreestimulación que ejercen los impulsos eléctricos en las glándulas sexuales accesorias (Dziuk *et al.*, 1954; Pineda *et al.*, 1987). El contenido total de proteínas se encontró aumentado en el PS obtenido mediante EE, esto también tendría origen en el lugar de acción de la EE, ya que las glándulas sexuales y más específicamente las vesículas seminales, son las que ejercen el mayor aporte al contenido proteico del PS. Adicionalmente, Henault *et al.* (1995) observaron que la calidad espermática disminuía fuertemente si las vesículas seminales eran removidas, confirmando la hipótesis de que son las proteínas originadas en estas glándulas las que mayor efecto ejercen sobre la calidad seminal.

La cantidad y composición del PS posiblemente determina la calidad de los espermatozoides, tal como se ha demostrado previamente (Ledesma y col., 2012; López-Rodríguez *et al.*, 2013; Rickard *et al.*, 2014). El PS de los mamíferos juega un papel muy importante en el mantenimiento de la movilidad y viabilidad espermática, preservando la integridad de las membranas plasmáticas. Varios autores han demostrado que si la concentración de PS en el medio disminuye se ven afectadas negativamente la movilidad, actividad metabólica y capacidad fecundante en los espermatozoides eyaculados en diferentes especies como ovinos (Ashworth *et al.*, 1994; Graham, 1994; Maxwell *et al.*, 2007), conejos (Castellini *et al.*, 2000), bovinos (Maxwell *et al.*, 1998; Garner *et al.*, 2001) y porcinos (Centurion *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004). Por lo tanto, una mayor proporción de PS debería ser beneficiosa y podría explicar en parte los mejores parámetros de calidad observados en este estudio en los espermatozoides colectados con EE. En trabajos realizados en nuestro grupo, donde se colectó semen por medio de VA y EE y luego de separar los espermatozoides del PS, se reconstituyó el eyaculado con el PS opuesto al método de

obtención de las células, se observó un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional e intacta, acrosomas intactos y mayor potencial fecundante, luego de la criopreservación, en espermatozoides obtenidos con EE en comparación con los obtenidos con VA, independientemente del PS agregado. Esto nos sugirió que el contacto inicial con el PS durante la eyaculación determina la calidad seminal. De acuerdo con Dott *et al.* (1979), esto sería posible ya que el contacto inicial del espermatozoide con el PS al momento de la eyaculación marca una conducta particular en los espermatozoides que no se modificaría con los subsecuentes lavados.

El perfil proteico del PS utilizando electroforesis en una y dos dimensiones (1D y 2D-PAGE) como método de detección se ha utilizado previamente para la caracterización de las proteínas de PS de bovino (Desnoyers *et al.* 1994), jabalí (Jonakova *et al.*, 2007), equino (Brandon *et al.*, 1999) y ovino (Jobim *et al.*, 2005). Según Bergeron *et al.* (2005), Jobim *et al.* (2005) y Cardozo *et al.* (2006) las principales proteínas presentes en el PS ovino corresponden a un grupo de proteínas de bajo peso molecular (12-30 kDa). Nosotros observamos que este grupo de proteínas se vio aumentado de manera significativa en el semen obtenido mediante EE. Además, una proteína (31 kDa, pI 4,8) estuvo presente únicamente en el PS obtenido con EE cuando se analizó por 2D-PAGE. Por su PM y su pI, ésta podría corresponder a la glucoproteína ALFA-2-HS, un inhibidor de proteasa de amplio espectro que regula la función espermática luego de la cópula (Hedrich *et al.*, 2010). Sin embargo, el mecanismo por el cual ejerce su efecto aún es desconocido (Souza *et al.*, 2012). La proteína llamada EPIDIDYMALSECRETORYPROTEIN E1, identificada como aumentada en el PS obtenido por EE por 2D-PAGE, es una proteína de unión al colesterol originada en el epidídimo de mamífero y es la más abundante en la cola epididimaria. Esta se une a los espermatozoides y podría ayudar a la adecuada maduración de los mismos (Moura *et al.*, 2010). Jobim *et al.* (2005) sugirieron que esta proteína está relacionada con una elevada congelabilidad del semen bovino.

Graham (1994) y Maxwell *et al.* (1999) demostraron que el agregado de PS aumentó la resistencia espermática a los daños ocasionados por la criopreservación. Adicionalmente, se demostró que este efecto crioprotector del PS está dado por la presencia de determinadas proteínas, entre estas RSVP22 y RSVP14. En el presente estudio, mediante la combinación de la información obtenida por 1D SDS, 2D-PAGE y espectrometría de masas, pudimos identificar en el PS las proteínas RSVP22 y RSVP14 secretadas por las vesículas seminales, además de BINDEROFSPERM 5

PRECURSOR. Estas tres pertenecen a la familia de las BSP (BINDER OF SPERM PROTEINS) y que se caracterizan por tener un doble dominio de fibronectina tipo II en tándem, como otras proteínas del PS de otras especies, entre ellas PDC-109 (Esch *et al.* 1983), GSP-14/15 kDa y RSP15 (Bergeron *et al.*, 2005). El dominio FN-II interactúa con los fosfolípidos colina presentes en la superficie espermática, con lipoproteínas de alta y baja densidad y con heparina, estabilizando las membranas y posteriormente desestabilizándolas en el tracto genital femenino (Manjunath; Therien, 2002). Esto sugiere que tendrían actividad decapacitante. También vimos aumentada en el PS obtenido con EE, una proteína llamada CLUSTERIN, que es la principal glicoproteína presente en la rete testis del testículo ovino. Las células de Sertoli serían la fuente principal de esta proteína (Blaschuk *et al.*, 1983). CLUSTERIN también se encuentra involucrada en la maduración de las gametas (Howes *et al.*, 1998) y posee sitios de unión a heparina (Pankhurst *et al.*, 1998).

El hecho de que las proteínas consideradas crioprotectoras, por su capacidad de estabilizar las membranas, estén aumentadas en el PS obtenido por EE podría explicar la mejor calidad de los eyaculados obtenidos con esta metodología luego de la congelación/descongelación. Esta mejor calidad fue inferida por el mayor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra, lo cual es representativo de la viabilidad celular.

Las células espermáticas producen especies reactivas del oxígeno (ROS) como parte de su metabolismo normal. Sin embargo, si se producen en exceso estas moléculas son perjudiciales para las células, lo que conduce a una disminución de la viabilidad y de la integridad acrosómica, alteración del ADN y deterioro mitocondrial (Aitken; Koppers, 2011). Se ha descrito que la criopreservación aumenta la producción de ROS (Álvarez; Storey, 1992; O'Flaherty *et al.*, 1997) y que los espermatozoides congelados/descongelados tienen una gran sensibilidad a estos ROS debido a la pérdida de su limitada capacidad antioxidante (Bilodeau *et al.*, 2000). Muiño-Blanco *et al.* (2008) plantearon la hipótesis de un potencial efecto antioxidante de las proteínas RSVP14 y RSVP20. Teniendo en cuenta la capacidad antioxidante limitada de las células espermáticas, los componentes del PS son responsables de protegerlas contra el estrés oxidativo. Como los eyaculados obtenidos con EE tienen mayor proporción de estas dos proteínas, podría explicar los mejores resultados observados los parámetros de calidad seminal evaluados.

Una de las mayores alteraciones causadas por la exposición a temperaturas de congelación en los espermatozoides, es la denominada criocapacitación (Maxwell;

Watson, 1996; Bailey *et al.*, 2003). Los espermatozoides crio-capacitados tienen una menor vida media y menor capacidad de adhesión a las células del tracto genital femenino que los no capacitados. Además, éstas células son proclives a sufrir reacción acrosómica espontánea, ocasionado bajos porcentajes de preñez cuando el semen criopreservado se utiliza en IA (Maxwell, 1986). El agregado de PS revirtió la criocapacitación en espermatozoides de cerdo (Vadnais *et al.*, 2005) y mejoró la fertilidad posterior en ovinos (Maxwell *et al.*, 1999) y cerdos (Larsson; Einarsson, 1976). Barrios *et al.* (2005) observaron que este efecto del PS en la reducción del porcentaje de espermatozoides criocapacitados es debida a las proteínas RSVP14 y RSVP20. Estos mismos autores observaron que, tanto la capacitación *in vitro* como la posterior reacción acrosómica, reducen el contenido de ambas proteínas en la superficie espermática y solo el 35% de ellas permanecen en los espermatozoides después de ambos procesos (Barrios *et al.*, 2005). En el presente trabajo, pese a que el contenido de estas dos proteínas fue mayor en el PS obtenido con EE, no encontramos diferencias en el porcentaje de espermatozoides capacitados, evaluados por CTC, luego de la congelación en los eyaculados obtenidos con ambos métodos. Sin embargo, observamos un menor porcentaje de espermatozoides reaccionados en los eyaculados obtenidos con EE. En estos espermatozoides reaccionados ha ocurrido la liberación del contenido de enzimas del acrosoma, lo cual comprometería su habilidad fertilizante (Wang *et al.*, 2007). Por lo tanto, sería interesante reducir el número de estos en el semen utilizado en una IA.

En este capítulo se ha podido demostrar que el método de colecta seminal influye en la calidad de los eyaculados obtenidos, tanto en estado fresco como luego de la congelación/descongelación. Los eyaculados obtenidos mediante EE presentaron mayor calidad que los obtenidos con VA, esto podría estar relacionado al mayor contenido de PS, como a la mayor abundancia de proteínas de bajo peso molecular, consideradas crioprotectoras y más específicamente, al mayor contenido de RSVP14 y RSVP22.

## **Capítulo III.**

**Capacidad de las proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides de revertir los daños ocasionados por la criopreservación**

### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### **Proteínas del plasma seminal que interactúan con las membranas espermáticas**

El efecto beneficioso del PS sobre los espermatozoides criopreservados, tanto de prevenir como de revertir los daños ocasionados por la congelación/descongelación, se deben en gran parte a la acción de ciertas proteínas que lo componen y que tienen la capacidad de adherirse a las membranas espermáticas y estabilizarlas (Barrios *et al.*, 2005). En nuestro grupo de trabajo, a través de las investigaciones realizadas por Bernardini *et al.* (2011), se desarrolló un método que permitió identificar un grupo de proteínas del PS que tienen la capacidad de interactuar con los componentes de la membrana plasmática de espermatozoides criopreservados (PPSiE). Esta PPSiE está compuesta por las proteínas LACTOTRANSFERRIN, EPIDIDYMAL SECRETORYPROTEIN E1, SYNAPTOSOMAL-ASSOCIATEDPROTEIN 29 (SNAP-29), RSVP14 y RSVP20 y demostró ser capaz de mejorar la movilidad y la ultraestructura mitocondrial de los espermatozoides sometidos a los procesos de congelación/descongelación. Sin embargo, este método desarrollado por Bernardini *et al.* (2011) presenta la desventaja de su bajo rendimiento, lo que dificulta su uso como herramienta biotecnológica. Tres de estas proteínas (EPIDIDYMAL SECRETORY PROTEIN E1, RSVP14 y RSVP20), coinciden con las reportadas en el capítulo anterior, como aumentadas en el PS obtenido por EE. Estas pertenecen a la familia de proteínas con doble dominio de fibronectina tipo II (FN-II). Como se mencionó, este dominio interactúa con fosfolípidos de colina presentes en la membrana espermática, con lipoproteínas de alta y baja densidad y con heparina, desempeñando un papel importante en la estabilización de las membranas (Manjunath; Thérien, 2002), por lo cual se podría pensar que serían las responsables de la actividad decapacitante descrita para el PS. Esta familia de proteínas inicialmente fue descrita como las más abundantes en el PS bovino, también han sido llamadas BSP (Manjunath, 1984). Se caracterizan por su bajo peso molecular (12–30 kDa) y por una estructura secundaria común que contiene dos dominios de fibronectina en tándem y una extensión amino-terminal, variable entre cada proteína. Proteínas homólogas a las BSP han sido identificadas también en equinos, caprinos, bisones, ovinos y como componentes menores en cerdos (Manjunath *et al.*, 2007, 2009). A su vez, estas pueden ser agrupadas en tres subfamilias (BSPH4, BSPH5 y

BSPH6) (Fan *et al.*, 2006). El alto grado de conservación entre las diferentes especies de mamíferos indicaría la importancia de éstas en la reproducción.

Por otro lado, como ya ha sido mencionado, la composición del PS es muy variable entre especies, entre animales de la misma especie, entre eyaculados de un mismo animal y como ha sido demostrado en el capítulo II, por el método de colecta utilizado. Adicionalmente, la composición proteica del PS se ve influenciada por la estación del año, en el caso de los reproductores con estacionalidad marcada (Cardozo *et al.*, 2006; Butts *et al.*, 2010; Leahy *et al.*, 2010; Domínguez *et al.*, 2008). Se conoce, además, que reproductores con diferente grado de fertilidad tienen una composición proteica diferencial en su PS (Moura *et al.*, 2006).

Por todo esto hipotetizamos que, así como varía la composición del PS, también se afectará la capacidad de las proteínas para revertir los daños ocasionados por los procesos de congelación/descongelación en los espermatozoides.

### **Subpoblaciones de células en los eyaculados**

El eyaculado de los mamíferos está constituido por una población heterogénea de espermatozoides en la cual coexisten diferentes subpoblaciones con diferencias funcionales (Curry; Watson, 1994; Harrison, 1996; Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999). Esta heterogeneidad hace posible que el tracto genital femenino ejerza múltiples procesos selectivos que finalmente reducirán una población de millones a unos pocos espermatozoides competentes (Holt; Van Look, 2004). Muchos investigadores han identificado diferentes subpoblaciones basándose en las características de movilidad mostradas por los espermatozoides individuales mediante el uso de los sistemas CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*), que han mejorado los análisis de movilidad espermática haciéndolos más objetivos (Quintero-Moreno *et al.*, 2003; Martínez-Pastor *et al.*, 2005; Martínez-Pastor *et al.*, 2011). Estos análisis permiten la evaluación individual de células espermáticas y con ello la identificación y cuantificación de diferentes poblaciones espermáticas según sus patrones de movimiento.

En los últimos 20 años se han aplicado herramientas de análisis estadístico multivariado en la identificación de subpoblaciones espermáticas, haciendo posible determinar cómo tratamientos específicos afectan a estas poblaciones o evaluar las diferencias de subpoblaciones entre reproductores, ya que muchas veces el estudio

del efecto de determinados tratamientos sobre la población espermática total no refleja la respuesta de las subpoblaciones.

Es por este motivo que el estudio de las subpoblaciones del eyaculado y del efecto del PS o de sus proteínas sobre ellas contribuirá a mejorar el entendimiento de su capacidad crioprotectora.

### **Objetivos particulares de este capítulo**

- Analizar el efecto del agregado de PPSiE proveniente de plasma seminal obtenido con vagina artificial y electroeyaculación en dos estaciones (reproductiva y no reproductiva) a espermatozoides congelados/descongelados.
- Optimizar el protocolo de extracción de las proteínas del plasma seminal que interactúan con la membrana plasmática de los espermatozoides (PPSiE).
- Evaluar si la fertilidad de los espermatozoides determina el efecto de los tratamientos.
- Identificar las subpoblaciones presentes en semen criopreservado en base a sus características de movilidad.
- Comparar los tamaños relativos de las diferentes subpoblaciones en los eyaculados de carneros de alta y baja fertilidad.
- Evaluar la habilidad de las PPSiE y del PS colectados con vagina artificial y electroeyaculación en estación reproductiva y fuera de estación, de modificar los tamaños de estas subpoblaciones en carneros de baja fertilidad.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Lugar y período experimental**

Instalaciones de la facultad de ciencias veterinarias de Paysandú, Universidad de la República, Uruguay, en el período septiembre-octubre del año 2014(experiencia uno) e Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) de la Universidad de León, España, en el período mayo-noviembre del año 2015 (experiencia dos).

### **3.2.2. Organización del trabajo**

Para cumplir con los objetivos planteados en este capítulo se realizaron dos experiencias. La primera, realizada en Paysandú, Uruguay se buscó optimizar el protocolo de obtención de la fracción de proteínas del PS que interactúan con la membrana de los espermatozoides (PPSiE) y se evaluó el efecto del agregado de PPSiE obtenida con VA y EE a espermatozoides criopreservados luego de su descongelación sobre patrones de movilidad a diferentes períodos de incubación. Para una mejor comprensión de los materiales y métodos empleados y de los resultados obtenidos la denominaremos “experiencia uno”.

En la segunda experiencia realizada en la Universidad de León, España se realizó para cumplir los siguientes objetivos:

- Analizar el efecto del agregado de PPSiE obtenidas con VA y EE en dos estaciones (reproductiva y no reproductiva) a espermatozoides congelados/descongelados sobre la movilidad a un tiempo fijo, sobre parámetros fisiológicos espermáticos y sobre el estado de capacitación de los mismos;
- Evaluar si la fertilidad de los espermatozoides determina el efecto de los tratamientos;
- Detectar la presencia de subpoblaciones en espermatozoides provenientes de carneros con diferente grado de fertilidad;
- Evaluar el efecto de las PPSiE sobre los espermatozoides considerando las diferentes subpoblaciones.

Para una mejor comprensión de los materiales y métodos empleados y de los resultados obtenidos la denominaremos “experiencia dos”.

### **3.2.3. Obtención de eyaculados**

Experiencia uno:

La obtención de los eyaculados se realizó de cinco carneros adultos de la raza Texel, mediante VA y EE, dos veces por semana, con un período de abstinencia de dos días entre colectas. Se conformaron pools de semen por método y día de colecta que fueron diluidos y criopreservados de la misma manera que fue detallado en el capítulo II de esta tesis.

Experiencia dos:

Se utilizaron espermatozoides congelados pertenecientes a 10 carneros adultos de la raza Assaf divididos en dos grupos de 5 carneros cada uno de acuerdo a su fertilidad, en baja ( $35,3 \pm 3,0\%$ ) y alta ( $60,4 \pm 1,5\%$ ). El semen congelado fue proporcionado por OVIGEN (Centro de Selección y Mejora Genética de Ovino y Caprino de Castilla y León, Toro, España).

### **3.2.4. Obtención de plasma seminal y proteínas**

Experiencia uno:

La obtención de PS y PPSiE en la primera experiencia se llevó a cabo de los mismos carneros de la raza Texel a partir de eyaculados colectados con ambos métodos de extracción (VA y EE).

Experiencia dos:

En el caso de la segunda experienciase utilizaron 8 carneros adultos pertenecientes a la raza Assaf.

En ambas experiencias se siguió el siguiente protocolo. Brevemente, con los eyaculados que presentaron una movilidad total  $\geq 80\%$  se formó un pool por método de colecta que luego fue dividido en dos partes. Una de estas partes fue utilizada para la

obtención de PS, con la misma metodología detallada en el capítulo II. La otra mitad del pool de semen fue utilizado para recuperar las PPSiE, para lo cual los eyaculados fueron lavados 10 veces con PBS para remover el exceso de PS no unido (800 x g, 10 min), luego los espermatozoides libres de PS fueron incubados con 200 µl de buffer 10 mM Glicina-HCl pH 3 (20 min, temperatura ambiente, en agitación). Finalmente, los espermatozoides fueron centrifugados y el sobrenadante conservado y neutralizado con Tris-HCL 2 M pH 9,5. La concentración de proteína del PS y la PPSiE fue determinada mediante el método descrito por Bradford (1976), utilizando BSA para realizar la curva estándar. La concentración de las proteínas eluidas desde la superficie espermática proveniente de un volumen conocido de PS fue calculada en mg/ml.

Para la comparación del método de obtención de PPSiE propuesto por Bernardini *et al.*, (2011) con el alternativo propuesto por nosotros, durante la primera experiencia una fracción de las PPSiE se obtuvo siguiendo la siguiente metodología: espermatozoides epididimarios congelados fueron descongelados y lavados en PBS (100 xg, 10 min). El pellet espermático obtenido se sonicó, ultracentrifugó (120.000 x g, 3 h, 5 °C) y se separó la fracción de membrana del pellet celular. El pellet fue suspendido en buffer TEN (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl), conteniendo 1 mM de ortovanadato de sodio, 1 mM fluoruro desodio, 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 10 g/l pepstatina A, 0,1 mM TLCK (N $\alpha$ -Tosyl-Lys-chloromethylketone, hydrochloride) y 0,5% Triton X-100. Posteriormente, la suspensión fue incubada por 1 h a 4 °C y centrifugada (16.000 x g, 20 min, 4 °C). Las proteínas de membrana solubilizadas fueron lavadas con PBS y concentradas en membranas YM-10 (Amicon). Para obtener las PPSiE se incubó PS conteniendo 500 µg de proteínas con las proteínas de membrana solubilizadas obtenidas anteriormente en 200 µL de TBS, ON a temperatura ambiente, en agitación. Al finalizar esta incubación, las membranas de PVDF conteniendo las proteínas de membrana inmovilizadas fueron lavadas con TBS para separar las proteínas retenidas (PPSiE). La elución y neutralización se hicieron de la misma manera que en el protocolo alternativo mencionado en el paso anterior.

### **3.2.5. Detección de RSVP14 y RSVP20 por western blot**

Las proteínas de la PPSiE se separaron por medio de electroforesis en geles de 12 % (p/v) acrilamida que luego fueron transferidas a membranas de PVDF en un equipo de transferencia TE 70 PWR (Amersham) a 45 mA durante 2 h. La transferencia se realizó en buffer Towbin (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20 % (v/v) metanol). Una vez transferidas, se procedió a bloquear los sitios de unión inespecífica a proteínas en la membrana con buffer bloqueante (3% BSA en TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5), durante 30 min. Posteriormente, la membrana bloqueada se incubó con anticuerpos policlonales contra RSVP14 y RSVP20 (donación Dr. Cebrián-Pérez, Universidad de Zaragoza, España) a una dilución de 1:2000 y 1:500, respectivamente, durante 2 horas a 37 °C en agitación suave. Luego de tres lavados en TBS-T las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución de 1:10000 (A8025 Sigma) durante dos hs en agitación. Luego de tres lavados para quitar los restos de anticuerpo, la membrana se equilibró por 15 min en buffer de fosfatasa alcalina (AP) conteniendo Tris 0,1 M, pH 9,5; NaCl 0,1 M y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. La actividad de fosfatasa alcalina se reveló con 0,33 mg/ml nitro-blue tetrazolium (NBT) y 0,01 mg/ml 5Br-4-Cl-3-indol fosfato (BCIP) en buffer AP hasta el desarrollo de color.

### 3.2.6. Diseño Experimental

#### Experiencia uno:

Para la primera experiencia tres pajuelas de semen criopreservado fueron descongeladas al azar mediante inmersión en BM (37 °C, 20 s), luego los espermatozoides móviles se seleccionaron mediante una columna de lana de vidrio (Arzondo *et al.*, 2012) con la finalidad de eliminar la población de espermatozoides muertos y los restos de diluyente de congelación. La columna de lana de vidrio se lavó y equilibró previamente con PBS. Luego del método de selección, se midió la concentración mediante el sistema de CASA y se hicieron alícuotas de 10 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml con PBS. A cada una de esas alícuotas se les agregó PS colectado con VA, PS colectado con EE, PPSiE colectada con VA, PPSiE colectada con EE o PBS (control). En este experimento únicamente se evaluaron parámetros de movilidad medidos con CASA a tres tiempos de incubación (15, 30 y 45 minutos) a 37 °C.

### Experiencia dos:

En la segunda experiencia tres pajuelas pertenecientes a carneros de baja o alta fertilidad fueron descongeladas al azar mediante inmersión en BM (37 °C, 20 s), vertidas en 1 mL de Androcoll-OTM y centrifugadas para remover las células muertas y el PS (800 x g, 5 min y luego 1200 x g, 10 min). El sobrenadante fue removido y el pellet espermático resuspendido en 250 µl de PBS y nuevamente centrifugado (800 x g, 5 min). El pellet resultante fue resuspendido en PBS y se calculó su concentración y movilidad. Para formar los tratamientos una alícuota (160 µl) de la suspensión espermática ( $10 \times 10^6$  espermatozoides) fue suplementada con 40 µL de 5 soluciones diferentes (200 µl volumen final) e incubadas a 37 °C durante una hora. Los medios de suplementación fueron los siguientes:

- 40 µL (20% v/v) de PS colectado con VA (40 µl= 0,6 mg de proteína en PS de primavera o 1,4 mg para PS de otoño)
- 40 µL (20% v/v) de PS colectado con EE (40 µl= 0,48 mg de proteína en PS de primavera o 1,2 mg en PS de otoño)
- 40 µL de PPSiE colectada con VA (7 µg para la colecta de primavera o 23 µg para la colecta de otoño) en PBS 0,5% fructosa.
- 40 µL de PPSiE colectada con EE (3,2 µg para la colecta de primavera o 29 µg para la colecta de otoño) en PBS 0,5% fructosa.
- Control: 40 µL de PBS 0,5% fructosa.

La cantidad de PPSiE fue seleccionada en base al contenido proporcional de proteínas proporcionadas por un volumen equivalente de PS completo de acuerdo a lo reportado previamente (Bernardini *et al.*, 2011). La concentración de proteínas en PS fue 35,0 mg/ml y 30,0 mg/ml para VA y EE, respectivamente, en otoño y 15,0 mg/ml y 12,0 mg/ml para VA y EE, respectivamente, en primavera. La concentración de proteína en PPSiE en otoño fue 7,8 mg/ml y 5,8 mg/ml para VA y EE, respectivamente, en primavera fue 0,9 mg/ml y 0,8 mg/ml para VA y EE, respectivamente. Se realizaron cuatro réplicas experimentales con semen descongelado perteneciente a carneros de baja fertilidad y cuatro réplicas con semen descongelado de carneros de alta fertilidad a los cuales se los incubó con PS o PPSiE obtenidos en primavera. El segundo experimento fue realizado de la misma manera en otoño. Luego de una hora de incubación a 37 °C, fueron realizadas las siguientes determinaciones en los tratamientos y en el grupo control: movilidad con sistema CASA, parámetros

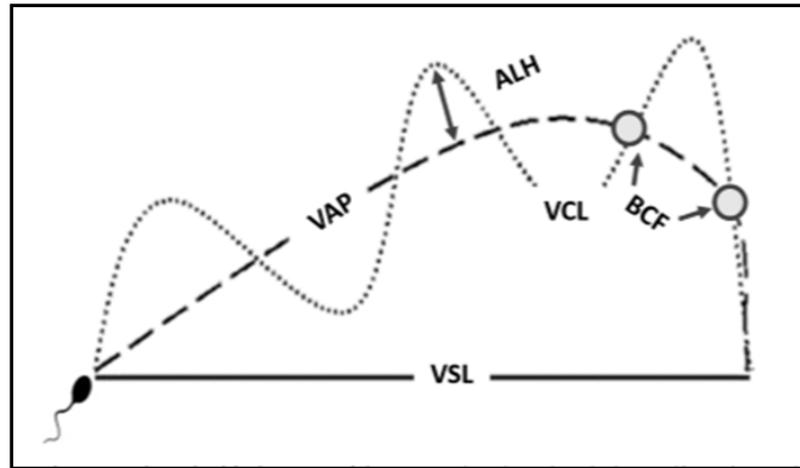
fisiológicos mediante citometría de flujo y estado de capacitación mediante western blott (fosforilación en tirosina).

### **3.2.7. Análisis de parámetros espermáticos**

#### **3.2.7.1. Movilidad espermática**

Los parámetros de movilidad fueron estimados mediante el uso de un sistema de análisis computarizado CASA (ISAS 1.0.4; Proiser SL, Valencia, Spain), para lo cual 5  $\mu\text{L}$  de la muestra fueron colocados en una cámara Makler (10  $\mu\text{m}$ ; Haifa Instruments, Israel), atemperada a 37 °C, y se examinó bajo un microscopio con contraste de fase (Nikon E400; negative contrast 8 optics). Se contaron un mínimo de cuatro campos y 200 células a 10x usando una cámara de video (Basler A312f, Basler Vision Components, Exton, PA, USA), a 53 cuadros/s y un tiempo de adquisición de 1 s. 10x. Los parámetros cinéticos grabados para cada espermatozoide fueron: movilidad total (MT; %), movilidad progresiva (MP; %), velocidad promedio (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad en línea recta (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), linealidad (LIN; %), rectitud (STR; %), índice de oscilación (WOB; %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH;  $\mu\text{m}$ ) y frecuencia de batido (BCF; Hz) (figura 11).

Los datos arrojados por el sistema CASA del patrón de movimiento de cada célula individual fueron reanalizados además aplicando el procedimiento en dos pasos de algoritmo de clusters AGNES (Fernández-Gago *et al.*, 2016) con el objetivo de definir las subpoblaciones espermáticas.



**Figura 11. Parámetros de velocidad espermática.** Se indica la velocidad curvilínea (VCL, distancia recorrida a lo largo de la trayectoria real por unidad de tiempo), la velocidad rectilínea (VSL, distancia recorrida entre el primer y el último punto de la trayectoria por unidad de tiempo) y la velocidad media (VAP, distancia recorrida a lo largo de la trayectoria media). Los índices de linealidad, rectitud y oscilación surgen de la relación entre estos 3 parámetros representados,  $VSL/VCL$ ,  $VSL/VAP$  y  $VAP/VCL$  respectivamente. Se representa, además, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, desplazamiento que efectúa la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal) y la frecuencia de batido de la cabeza (BCF, frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo).

### 3.2.7.2. Fisiología espermática

Los parámetros de evaluación de la fisiología espermática fueron evaluados mediante citometría de flujo utilizando un equipo Cyan Adp flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA). Los láseres utilizados para excitar los distintos fluorocromos fueron: 325-nm helium-cadmium UV para el Hoechst 33342, 488-nm argón-ion para YO-PRO-1, CM-H<sub>2</sub>DCFDA, M540 y PI y 633-nm helium-neón para MitoTracker Deep Red. Los parámetros adquiridos fueron FSC, SSC y la fluorescencia de cada fluorocromo. Los filtros utilizados fueron: 424/44 para Hoechst 3334, 2530/28 para YO-PRO-1 y CM-H<sub>2</sub>DCFDA, 575/25 para M540, 670LP para IP y 620/20 para MitoTracker deep red. La adquisición fue controlada usando el software Summit V4.3.02. Todos los parámetros fueron leídos utilizando amplificación logarítmica. Se creó una plantilla de adquisición en el software con el fin de discriminar los espermatozoides de los residuos dentro de los eventos adquiridos. Para descartar los residuos se utilizó un Plot FSC/SSC y Hoechst 33342 vs. PI. Un total de 5.000 espermatozoides fueron

adquiridos por muestra con un flujo de 200 células/segundo. Finalmente, el análisis de los datos se realizó mediante Weasel v. 3.2 (WEHI, Melbourne, Australia).

Los stocks de fluorocromos fueron preparados de la siguiente manera: Hoechst 33342 (Sigma B2261) 8,9 mM en agua Milli-Q; YO-PRO-1 iodide (491/509) (Invitrogen Y3603) 1 mM en DMSO; Ioduro de propidio (IP) (Sigma P4170) 1,5 mM en agua Milli-Q; Dichlorodihidrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) (Invitrogen C6827) 1 mM en DMSO; Merocyanine 540 (M540; Sigma) 1 mM en DMSO y Mitotracker Deep Red 633 (Invitrogen M22426) 100  $\mu$ M en DMSO. Todas las tinciones fueron mantenidas en la oscuridad y a -20 °C hasta el momento de utilizarlas.

### ***Permeabilidad de la membrana plasmática y actividad mitocondrial***

Las variaciones en la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides fueron evaluadas mediante la combinación YO-PRO-1/PI. PI atraviesa las membranas plasmáticas dañadas, emitiendo coloración roja al unirse al núcleo espermático. YOPRO-1 es un indicador de apoptosis que atraviesa las membranas plasmáticas de las células que tienen su permeabilidad aumentada emitiendo fluorescencia verde. La función mitocondrial se evaluó utilizando Mitotracker deep red, este fluorocromo es secuestrado en el interior de las mitocondrias y emite fluorescencia roja cuando estas están activas (elevado potencial de membrana). Las muestras fueron preparadas a  $10^6$  mL<sup>-1</sup> en PBS con 100 nM YO-PRO-1, 3  $\mu$ M PI y 100 nM Mitotracker deep red. Luego de un período de incubación de 15 minutos a 37 °C en la oscuridad, las muestras fueron analizadas. Considerando la permeabilidad de la membrana, los espermatozoides fueron clasificados de la siguiente manera: viables con membrana de permeabilidad normal (YO-PRO-1-/PI-); viables con membranas de permeabilidad alterada o apoptóticos (YO-PRO-1+/PI-) y no viables (YO-PRO-1+/PI+). Los datos fueron expresados como porcentajes de espermatozoides en cada categoría. Considerando la permeabilidad de membrana y la actividad mitocondrial los espermatozoides fueron clasificados de la siguiente manera: viables con potencial de membrana normal (MitoTracker+/YO-PRO-1-); viables con mitocondrias con potencial de membrana disminuido (MitoTracker-/YO-PRO-1-) y apoptóticos o no viables (YO-PRO-1+).

### ***Especies reactivas del oxígeno (ROS)***

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, capaces de existir en forma independiente, que se producen en todas las células como parte del metabolismo normal, aunque en determinadas situaciones ésta producción se ve incrementada. El conjunto de radicales libres que tienen la capacidad de producir daños oxidativos se les denomina Especies Reactivas del Oxígeno (ROS, según las siglas inglesas de reactive oxygen species). Para la detección de ROS intracelular se utilizó el fluorocromo CM-H<sub>2</sub>DCFDA, este compuesto se oxida a dichlorofluorescein (DCF) y emite fluorescencia a 530 nm en respuesta a 488 nm de excitación. Este colorante se combinó con PI para remover la población no viable del análisis. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> en PBS con 1 μM CM-H<sub>2</sub>DCFDA y 2,5 μg/ml PI y fueron analizadas luego de una incubación de 15 minutos a 37 °C en la oscuridad. Para el análisis se usaron los datos de la intensidad media de fluorescencia, luego de excluir la población PI+ (espermatozoides no viables).

### ***Fluidez de membrana***

Para realizar esta determinación se utilizó la combinación M540/YOPRO-1. M540 se une preferencialmente a las membranas que han perdido el empaquetamiento lipídico, mientras que YO-PRO-1 tiñe los núcleos de las células con permeabilidad aumentada (“apoptóticas” o no viables). Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera: 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> en PBS con 2,7 μM M540 y 0,1 μM YO-PRO-1 y fueron analizadas luego de una incubación de 15 minutos a 37 °C en la oscuridad. Los espermatozoides fueron clasificados de la siguiente manera: no viables o con permeabilidad aumentada (YO-PRO-1+); poca fluidez de membrana (M540-/YO-PRO-1-) y elevada fluidez de membrana (M540+/YO-PRO-1-).

### **3.2.7.3. Estado de capacitación**

La fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas es uno de los procesos moleculares que acompaña a la capacitación espermática. Para realizar esta determinación alícuotas de semen con 5x10<sup>6</sup> células fueron centrifugadas a 7500 x g

durante 5 minutos a 4 °C y luego se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las muestras fueron mezcladas con buffer Laemmli 5x [6,2, 5% (v/v) glicerol, 0,4% (p/v) SDS, 0,02% (p/v) azul de bromofenol] bajo condiciones reductoras (100 mM DTT) y calentadas a 100 °C durante 5 minutos. Las proteínas solubilizadas fueron separadas por electroforesis en 10% (w/v) de acrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y transferidas a membranas de PVDF (BIO-RAD). Los sitios no específicos fueron bloqueados con una solución bloqueante [TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 8, 120 mM NaCl, 0,05% Tween 20% y 5% de leche descremada en polvo] durante una hora a temperatura ambiente. Las tirosinas fosforiladas fueron detectadas mediante incubación con el anticuerpo primario Antiphosphotyrosine clone 4G10 monoclonal mouse (Millipore) a una dilución de 1:2000 en solución bloqueante, durante toda la noche a 4°C, en agitación constante. Luego de varios lavados en TBS-T, las membranas fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse IgG-HRP (GE, NA9311) a una dilución de 1:5000 en solución bloqueante. Posteriormente las membranas fueron reveladas con reactivo de quimioluminiscencia (ECL commercial kit, GE Amersham Biosciences) y detectadas en películas autorradiográficas (Hyperfilm™ Amersham Biosciences). Las imágenes digitalizadas de los western blots fueron analizadas mediante el software ImageJ 1.43 (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015). La señal de fosforilación fue evaluada como volumen (área/intensidad).

Luego del revelado se procedió a realizar el control de carga. Para lo cual las membranas se lavaron durante 20 minutos a 60 °C en buffer de stripping (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM β-mercaptoethanol, pH 6,5), se bloquearon nuevamente y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario mouse monoclonal anti-tubulin (Sigma) a una dilución de 1:5000. La incubación con el anticuerpo secundario y el revelado fueron realizados de la misma manera descrita anteriormente. La normalización de los datos se realizó dividiendo las densidades medias de las proteínas fosforiladas por las correspondientes densidades de tubulina y expresadas como volumen (área/intensidad).

### **3.2.8. Análisis estadístico de los datos**

Los parámetros de calidad espermáticos se compararon mediante ANOVA utilizando el procedimiento MIXED del Statistical Analysis System versión 8.2 (SAS Institute INC, Cary, NC). Los datos de la evaluación del semen descongelado se utilizaron como covariable. El modelo estadístico incluyó el efecto delagregado de PS o PPSiE, método de colecta, estación y sus interacciones. Los resultados se expresaron como medias mínimas cuadradas (LSM)  $\pm$  error estándar de las medias (SEM). Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .

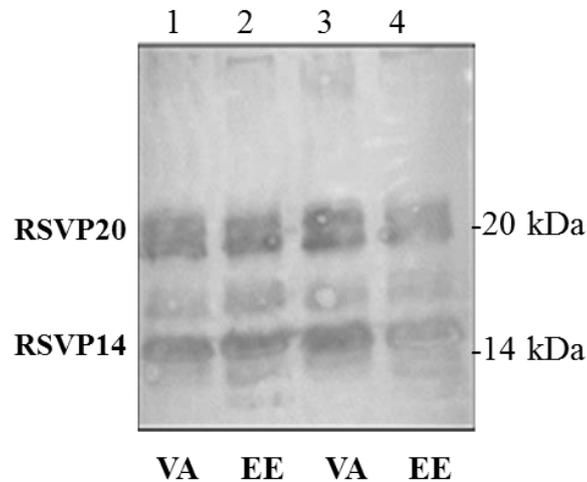
Los datos del análisis de subpoblaciones aplicando el procedimiento en dos pasos de algoritmo de clusters AGNES fueron procesados en el ambiente estadístico R (R Development Core Team, 2011). Los datos de la evaluación de las diferencias entre carneros con baja o alta fertilidad (control) se analizaron utilizando un modelo lineal general (GLM) sin efectos aleatorios. Se realizaron procedimientos teórico-informativos para determinar el mejor modelo de ajuste, computando AICc (Akaike Information Criterion for small samples; Johnson; Omland, 2004; Symonds; Moussalli, 2011). Para evaluar el efecto de las PPSiE y del PS colectados con VA o EE, en estación reproductiva o contraestación se utilizó un modelo general de efectos mixtos lineales (GLMM). Este análisis es particularmente útil cuando los datos no son independientes (Pinheiro; Bates, 2000). El uso del GLMM permite la inclusión de datos para una muestra de espermatozoides como un efecto aleatorio y, por lo tanto, la contabilización de las correlaciones dentro de la muestra en todos los modelos (Littell *et al.*, 2000).

### 3.3. RESULTADOS

#### Experiencia uno

##### 3.3.1. Optimización de la metodología para obtener proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides (PPSiE)

Partiendo del conocimiento de que existen proteínas que son retenidas por las membranas de los espermatozoides y que, por su alta afinidad, solo son liberadas por cambios de pH (Bernardini *et al.*, 2011), se precipitaron espermatozoides de eyaculados obtenidos por ambos métodos de colecta y luego de eliminar las proteínas libres, se cosecharon las proteínas unidas con mayor afinidad. La diferencia entre este procedimiento y el reportado previamente por nuestro laboratorio es que se parte de células vivas en lugar de fracciones de membrana inmovilizadas obtenidas de espermatozoides de origen epididimario. Por lo tanto, la nueva metodología de obtención presentó dos ventajas, por un lado, la mayor cantidad de PS que se puede procesar y por el otro, al no requerir espermatozoides epididimarios, nos independizamos de la necesidad de animales castrados. Sin embargo, era necesario determinar si las proteínas consideradas con capacidad crioprotectora se encontraban presentes en la fracción de proteínas retenida colectada con VA y EE por este método en comparación con el reportado. Por medio de western blott se determinó que el perfil de proteínas con capacidad de interactuar con la membrana plasmática de los espermatozoides (PPSiE) fue similar entre protocolos de extracción. Así mismo no se detectaron diferencias entre métodos de colecta seminal (VA vs. EE), observándose las bandas correspondientes a RSVP 14 y RSVP 20 en todas las calles (figura 12).



**Figura 12. Inmunodetección de proteínas RSV14 y RSV20 en PPSiE obtenidas con VA: vagina artificial y EE: electroeyaculación.** En las calles 1 y 2 PPSiE obtenidas por método descrito por Bernardini et al. (2011) y calles 3 y 4 PPSiE obtenidas por método actual.

### 3.3.2. Efecto de las proteínas del plasma seminal que interactúan con la superficie espermática (PPSiE) sobre la movilidad espermática en función del tiempo de incubación

Para evaluar si la PPSiE era capaz de mejorar los parámetros de movilidad del semen descongelado en comparación con el PS completo, además del tiempo de incubación requerido, se incubaron espermatozoides con PPSiE, PS completo o sin tratamiento y se analizó la movilidad de manera objetiva por medio del sistema CASA. No detectamos diferencias significativas entre los tratamientos y el control para las variables movilidad total y progresiva. Como era esperable, la movilidad total disminuyó significativamente con el tiempo de incubación ( $p=0,007$ ) en todos los tratamientos. Con respecto a la movilidad progresiva, también se detectó efecto del tiempo de incubación ( $p=0,042$ ) para los tres tiempos evaluados.

Con respecto a los parámetros de medición de velocidad espermática pudimos observar que la suplementación con PPSiE ocasionó una disminución de VCL, VSL y VAP a los 30 y 45 minutos de incubación, a diferencia de lo ocurrido luego del agregado de PS colectado mediante VA que ocasionó un incremento significativo de estos parámetros (tabla 3).

En cuanto a la linealidad del movimiento (LIN), la frecuencia de batido (BCF), y el balanceo (WOB) disminuyeron luego del agregado de PPSiE en todos los tiempos evaluados. La suplementación con PS no tuvo efecto significativo sobre ninguno de ellos (tabla 3).

**Tabla 3.** Cinética de espermatozoides ovinos tratados con plasma seminal o sus proteínas colectados con vagina artificial y electroeyaculador evaluados a tres tiempos de incubación (15, 30, 45 min). En todos los casos se detectó interacción entre tratamiento y tiempo de incubación.

Parámetro (unidad)	Tiempo	PS VA	PS EE	PPSiE VA	PPSiE EE	Control
<b>Movilidad Total</b>	15	56,00 ±2,93	58,72 ±2,93	55,25 ±2,93	54,37 ±2,93	56,48 ± 2,93
	30	40,27 ±2,69	41,50 ±2,69	39,60 ±2,69	42,40 ±2,69	43,20 ± 2,69
	45	42,18 ±3,74	42,89 ±3,74	44,05 ±3,74	42,15 ±3,74	40,79 ± 3,74
<b>Movilidad Progresiva</b>	15	31,87 ±1,62	31,80 ±1,62	33,20 ±1,62	30,43 ±1,62	31,21 ± 1,62
	30	25,56 ±2,23	27,05 ±2,23	25,35 ± 2,23	24,00 ±2,23	25,46 ± 2,23
	45	25,61 ±2,60	28,61 ±2,60	26,15 ± 2,60	25,61 ±2,60	25,00 ± 2,60
<b>VCL (µm/s)</b>	15	103,74±9,39 <sup>a</sup>	81,74±9,39 <sup>b</sup>	83,23±9,39 <sup>b</sup>	64,80±9,39 <sup>c</sup>	78,64±9,39 <sup>ab</sup>
	30	82,71±4,74 <sup>a</sup>	66,71±4,74 <sup>b</sup>	43,50±4,74 <sup>c</sup>	40,20±4,74 <sup>c</sup>	75,26±4,74 <sup>ab</sup>
	45	46,67±3,81 <sup>a</sup>	55,75±3,63 <sup>a</sup>	32,11±3,81 <sup>b</sup>	20,96±4,01 <sup>b</sup>	49,96±3,63 <sup>a</sup>
<b>VSL (µm/s)</b>	15	79,89±7,16 <sup>a</sup>	52,69±7,16 <sup>b</sup>	49,45±7,16 <sup>b</sup>	36,42±7,16 <sup>b</sup>	50,05±7,16 <sup>b</sup>
	30	55,52±3,87 <sup>a</sup>	38,61±3,87 <sup>b</sup>	22,32±4,0 <sup>c</sup>	17,29±3,87 <sup>c</sup>	48,01±3,87 <sup>ab</sup>
	45	25,25±3,05 <sup>a</sup>	31,91±2,91 <sup>a</sup>	13,04±3,05 <sup>b</sup>	5,23±3,21 <sup>b</sup>	29,20±2,91 <sup>a</sup>
<b>VAP (µm/s)</b>	15	82,88±7,32 <sup>a</sup>	55,52±7,32 <sup>b</sup>	52,99±7,32 <sup>b</sup>	39,45±7,32 <sup>b</sup>	53,36±7,32 <sup>b</sup>
	30	58,13±3,89 <sup>a</sup>	41,43±3,89 <sup>b</sup>	25,02±4,03 <sup>c</sup>	20,31±3,89 <sup>c</sup>	51,08±3,89 <sup>ab</sup>
	45	27,52±3,05 <sup>a</sup>	34,26±2,92 <sup>a</sup>	15,79±3,05 <sup>b</sup>	7,98±3,21 <sup>b</sup>	31,67±2,92 <sup>a</sup>
<b>LIN (%)</b>	15	64,70±3,0 <sup>a</sup>	53,15±3,0 <sup>b</sup>	38,12±3,0 <sup>cd</sup>	33,01±3,0 <sup>d</sup>	45,37±3,0 <sup>bc</sup>
	30	52,35±4,13 <sup>a</sup>	42,0±4,13 <sup>b</sup>	28,92±4,13 <sup>c</sup>	25,10±4,13 <sup>c</sup>	47,12±4,13 <sup>ab</sup>
	45	35,23±2,27 <sup>a</sup>	40,46±2,27 <sup>a</sup>	22,13±2,27 <sup>b</sup>	17,45±2,27 <sup>b</sup>	37,26±2,27 <sup>a</sup>
<b>BCF (Hz)</b>	15	22,67±1,68 <sup>a</sup>	20,23±1,68 <sup>ab</sup>	12,98±1,68 <sup>cd</sup>	10,91±1,68 <sup>d</sup>	16,89±1,68 <sup>bc</sup>
	30	20,85±1,37 <sup>a</sup>	16,33±1,37 <sup>b</sup>	8,26±1,42 <sup>c</sup>	7,48±1,37 <sup>c</sup>	17,81±1,37 <sup>ab</sup>
	45	12,45±0,99 <sup>a</sup>	14,42±0,95 <sup>a</sup>	6,09±0,99 <sup>b</sup>	3,47±1,06 <sup>b</sup>	12,43±0,95 <sup>a</sup>
<b>WOB (%)</b>	15	69,04±2,46 <sup>a</sup>	59,93±2,46 <sup>b</sup>	47,00±2,46 <sup>cd</sup>	43,18±2,46 <sup>d</sup>	53,29±2,46 <sup>bc</sup>
	30	59,17±1,10 <sup>a</sup>	49,10±1,10 <sup>b</sup>	39,78±1,10 <sup>c</sup>	36,76±1,10 <sup>c</sup>	55,52±1,10 <sup>ab</sup>
	45	44,46±2,76 <sup>a</sup>	48,19±2,76 <sup>a</sup>	34,03±2,76 <sup>b</sup>	31,17±2,76 <sup>b</sup>	47,58±2,76 <sup>a</sup>
<b>ALH (µm)</b>	15	0,67±0,63	0,65±0,63	0,71±0,63	0,60±0,63	0,63±0,63
	30	0,63±0,03 <sup>a</sup>	0,61±0,03 <sup>a</sup>	0,45±0,03 <sup>b</sup>	0,45±0,03 <sup>b</sup>	0,61±0,03 <sup>a</sup>
	45	0,46±0,02 <sup>a</sup>	0,51±0,02 <sup>a</sup>	0,39±0,02 <sup>b</sup>	0,31±0,02 <sup>b</sup>	0,46±0,02 <sup>a</sup>

PS: plasma seminal; VA: vagina artificial; EE: electroeyaculación; PPSiE: proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad en línea recta; VAP: velocidad promedio; LIN: linealidad; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: frecuencia de corte de la línea de trayectoria. Se muestran valores medios ±SEM. Letras diferentes (abc) entre columnas dentro de la misma línea indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para el mismo tiempo de incubación ( $p < 0,05$ ).

**Experiencia dos:****3.3.3. Efecto de las proteínas del plasma seminal que interactúan con la superficie espermática (PPSiE) sobre parámetros espermáticos a tiempo fijo****3.3.3.1. Movilidad espermática**

Luego de la evaluación de los parámetros de movilidad espermática observamos que los espermatozoides provenientes de animales de alta y baja fertilidad, descongelados y lavados mediante gradientes de concentración (Androcoll-OTM) e incubados con PS registraron los mayores porcentajes de movilidad total y progresiva, mientras que la suplementación con PPSiE obtenidas con ambos métodos no tuvo efecto sobre estos parámetros. No detectamos diferencias significativas según la estación de colecta de PS y PPSiE ( $p \geq 0,05$ ).

Con respecto a los parámetros de velocidad espermática, la velocidad circular (VCL) y la velocidad recta (VSL) disminuyeron luego de la suplementación con PS y PPSiE obtenida con EE mientras que la colectada con VA no tuvo diferencias con el control. En el caso de la velocidad promedio (VAP), todos los medios de suplementación la disminuyeron.

En la valoración de las medidas de progresión, LIN, STR y WOB y desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH) y frecuencia de batido (BCF), LIN disminuyó luego del agregado de PPSiE colectada con EE. Contrariamente, STR, ALH y BCF se comportaron de la misma manera, disminuyendo luego del agregado de PS, sin diferencias entre los demás medios de suplementación y el control. El balanceo (WOB) aumentó luego del agregado de PS (tabla 4).

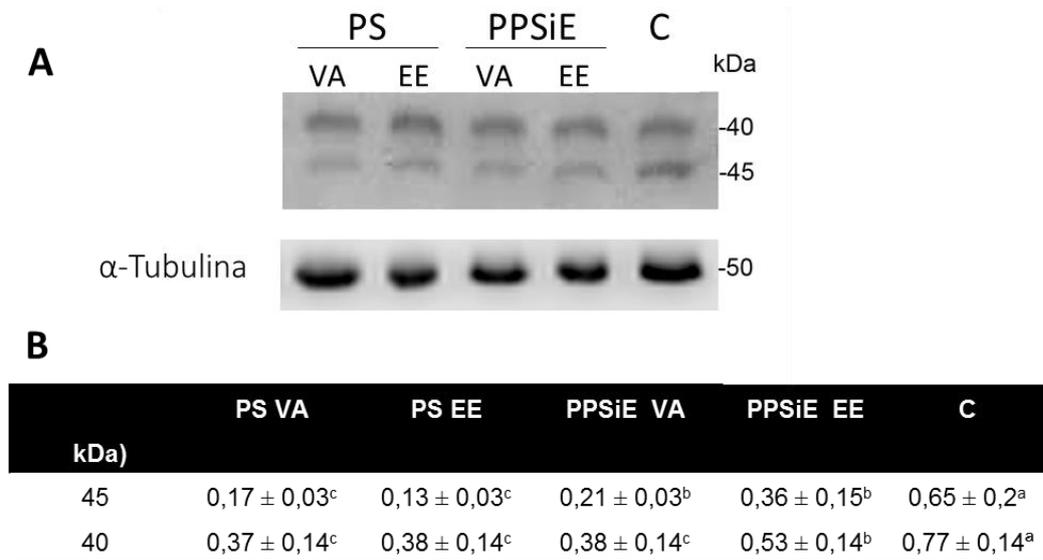
**Tabla 4.** Cinética de espermatozoides ovinos tratados con plasma seminal o sus proteínas colectados con vagina artificial y electroeyaculador evaluados luego de una hora de incubación. No se detectaron interacciones, por lo tanto, se consideró únicamente el efecto del tratamiento

Parámetro (unidad)	PS VA	PS EE	PPSiE VA	PPSiE EE	Control
MT (%)	74,13 ± 2,99 <sup>a</sup>	72,27 ± 2,99 <sup>a</sup>	60,07 ± 2,99 <sup>b</sup>	53,92 ± 2,99 <sup>b</sup>	54,30 ± 3,01 <sup>b</sup>
MP (%)	64,97 ± 2,64 <sup>a</sup>	63,73 ± 2,64 <sup>a</sup>	53,27 ± 2,64 <sup>b</sup>	46,18 ± 2,64 <sup>b</sup>	48,28 ± 2,78 <sup>b</sup>
VCL (µm/s)	110,19 ± 6,23 <sup>c</sup>	111,41 ± 6,23 <sup>c</sup>	148,92 ± 6,23 <sup>ab</sup>	136,76 ± 6,23 <sup>b</sup>	159,67 ± 6,26 <sup>a</sup>
VSL (µm/s)	80,01 ± 6,22 <sup>b</sup>	84,27 ± 6,22 <sup>b</sup>	108,22 ± 6,22 <sup>a</sup>	92,55 ± 6,22 <sup>b</sup>	117,40 ± 6,47 <sup>a</sup>
VAP (µm/s)	95,47 ± 5,61 <sup>b</sup>	98,14 ± 5,61 <sup>b</sup>	119,44 ± 5,61 <sup>b</sup>	105,50 ± 5,61 <sup>b</sup>	130,82 ± 5,84 <sup>a</sup>
LIN (%)	76,66 ± 2,76 <sup>a</sup>	78,08 ± 2,76 <sup>a</sup>	73,71 ± 2,76 <sup>ab</sup>	69,10 ± 2,76 <sup>b</sup>	75,71 ± 2,82 <sup>a</sup>
STR (%)	87,95 ± 1,10 <sup>c</sup>	89,28 ± 1,10 <sup>bc</sup>	92,83 ± 1,10 <sup>a</sup>	91,74 ± 1,10 <sup>ab</sup>	93,06 ± 1,12 <sup>a</sup>
WOB (%)	87,79 ± 1,83 <sup>a</sup>	88,39 ± 1,83 <sup>a</sup>	80,08 ± 1,83 <sup>b</sup>	76,66 ± 1,83 <sup>c</sup>	82,89 ± 1,83 <sup>b</sup>
ALH (µm)	1,50 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,10 <sup>b</sup>	2,10 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,07 ± 0,11 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	22,58 ± 0,79 <sup>bc</sup>	21,58 ± 0,79 <sup>c</sup>	25,72 ± 0,79 <sup>a</sup>	24,60 ± 0,79 <sup>ab</sup>	25,79 ± 0,84 <sup>a</sup>

PS: plasma seminal; VA: vagina artificial; EE: electroeyaculación; PPSiE: proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad en línea recta; VAP: velocidad promedio; LIN: linealidad; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: frecuencia de batido. Se muestran valores medios ±SEM. Letras diferentes (abc) entre columnas dentro de la misma línea indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para el mismo tiempo de incubación ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3.2. Estado de capacitación

Con el fin de evaluar si las proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides (PPSiE) tenían la habilidad de revertir los signos moleculares de capacitación, se analizó el estado de fosforilación en residuos tirosina de las proteínas espermáticas luego de una hora de incubación. Se detectaron dos bandas proteicas de aproximadamente 45 y 40 kDa. Su cuantificación densitométrica reveló que la fosforilación inducida por la congelación/descongelación fue revertida luego de 1 h de incubación tanto con PPSiE como con PS colectados con VA y EE. Observando una disminución significativa de las bandas de 45 kDa y 40 kDa en todos los tratamientos en comparación con el control (Fig. 13). La estación de colecta y la fertilidad no tuvieron ningún efecto sobre este parámetro ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 13. Evaluación del patrón de proteínas fosforiladas en residuos tirosina en espermatozoides congelados/descongelados.** La fosforilación fue detectada mediante western blot empleando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (A: panel superior) a partir de proteínas totales obtenidas luego de 1 h de incubación con PS: plasma seminal, PPSiE: proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides, obtenidos con VA: vagina artificial, EE: electroeyaculación. Se realizó una cuantificación de la intensidad de la señal detectada para cada banda relativizada a la intensidad detectada con anti-tubulina (A: Panel inferior). B: Densitometría de la intensidad de las bandas correspondientes a 45 y 40 kDa relativizadas cada una a su correspondiente intensidad de tubulina, letras diferentes (abc) indican diferencias significativamente diferentes (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.3.3.3. Parámetros fisiológicos del espermatozoide

El análisis de los parámetros fisiológicos considerados mediante citometría de flujo demostró que todos los parámetros evaluados fueron afectados por el tratamiento (Tabla 5). Contrariamente, no se detectó efecto de estación ni de la fertilidad para ninguna de las variables estudiadas ( $p > 0,05$ ). La adición de PS colectado con VA mejoró la viabilidad espermática, demostrado por el aumento de la población PI-/YO-PRO-1- en comparación con la adición de PS colectado con EE o de PPSiE ( $p < 0,001$ ).

El porcentaje de espermatozoides viables con membrana plasmática estable (YO-PRO-1-/M540-) fue mayor en los espermatozoides suplementados con PS, siendo significativamente mayor cuando el PS se obtuvo mediante VA ( $p = 0,014$ ). La funcionalidad mitocondrial también fue afectada por el tratamiento, alcanzando los

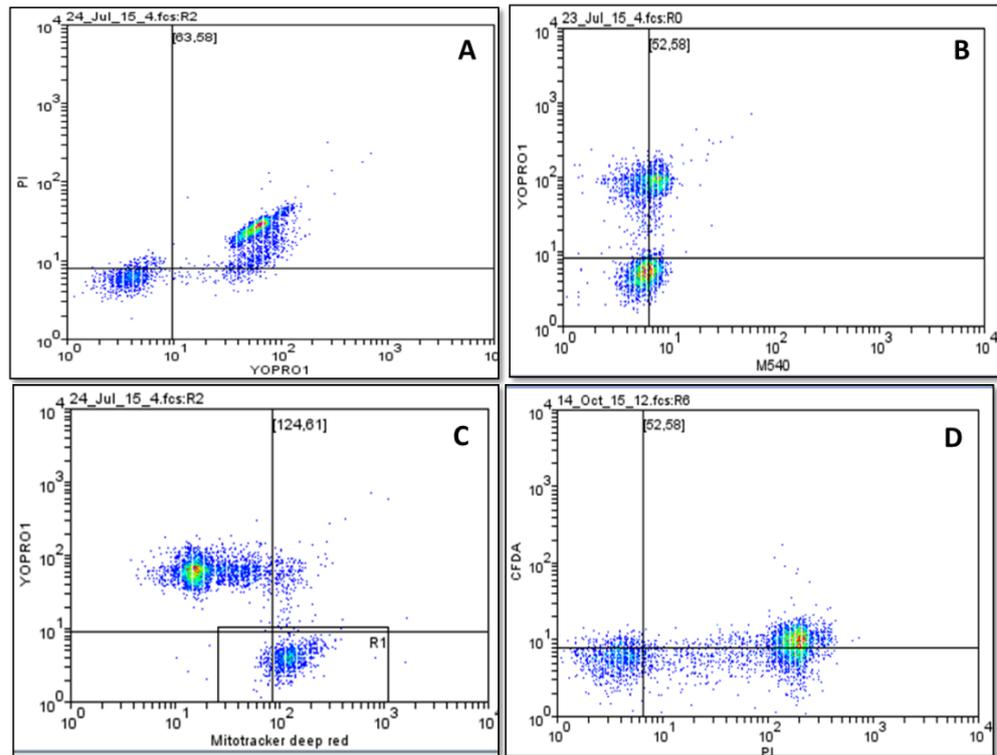
mayores valores de la población YP-/MT+ luego de la adición de PS. La presencia de ROS intracelular fue afectada por el tratamiento ( $p=0,045$ ) (PI-/H<sub>2</sub>DCFDA-), siendo menos luego de la adición de PS. El agregado de PPSiE obtenida tanto por VA como por EE no presentó diferencias significativas con el control en ninguna de las variables analizadas (Tabla 5).

De los ensayos realizados analizando la totalidad de la población espermática se puede concluir que las PPSiE tuvieron un efecto decapacitante sobre los espermatozoides, sin embargo, no fueron suficientes para mejorar la calidad seminal posdescongelación en comparación con el agregado de PS.

**Tabla 5.** Calidad de espermatozoides ovinos tratados con plasma seminal o sus proteínas colectados con vagina artificial y electroeyaculador (media  $\pm$  SEM). No se detectaron interacciones entre estación y tratamiento.

Parámetro (%)	PS VA	PS EE	PPSiE VA	PPSiE EE	Control
PI-/YO-PRO-1	44,60 $\pm$ 2,87 <sup>a</sup>	35,80 $\pm$ 2,47 <sup>b</sup>	27,02 $\pm$ 2,70 <sup>c</sup>	26,25 $\pm$ 2,64 <sup>c</sup>	25,20 $\pm$ 2,10 <sup>c</sup>
YO-PRO-1-/M540	44,56 $\pm$ 2,49 <sup>a</sup>	36,67 $\pm$ 1,71 <sup>b</sup>	27,23 $\pm$ 2,24 <sup>c</sup>	27,09 $\pm$ 2,15 <sup>c</sup>	25,32 $\pm$ 2,14 <sup>c</sup>
YO-PRO-1-/MT+	41,87 $\pm$ 4,89 <sup>a</sup>	37,40 $\pm$ 2,45 <sup>a</sup>	27,06 $\pm$ 2,35 <sup>b</sup>	28,27 $\pm$ 2,66 <sup>bc</sup>	26,1 $\pm$ 1,57 <sup>b</sup>
PI-/CM-H <sub>2</sub> DCFDA	23,52 $\pm$ 4,63 <sup>b</sup>	32,66 $\pm$ 4,12 <sup>a</sup>	24,39 $\pm$ 4,81 <sup>b</sup>	22,72 $\pm$ 3,99 <sup>b</sup>	20,92 $\pm$ 4,20 <sup>b</sup>

PS: plasma seminal; PPSiE: proteínas del plasma seminal que interactúan con el espermatozoide; VA: vagina artificial; EE: electroeyaculador; PI-/YO-PRO-1: viable con permeabilidad de membranas normal; YO-PRO-1-/M540: viable con baja fluidez de membrana; YO-PRO-1-/MT+: viable con elevado potencial de membrana mitocondrial; PI-/CM-H<sub>2</sub>DCFDA: viable con formación de radicales libres del oxígeno. Letras diferentes (abc) entre columnas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14. Esquema representativo de un citograma para espermatozoides teñidos con diferentes combinaciones de fluorocromos para evaluar parámetros fisiológicos celulares.** Se observan las poblaciones evaluadas para cada combinación. A: PI-/YO-PRO-1: espermatozoides viables con permeabilidad de membranas normal; B: YO-PRO-1-/M540: espermatozoides viables con baja fluidez de membrana; C:YO-PRO-1-/MT+: espermatozoides viables con elevado potencial de membrana mitocondrial y D: PI-/CM-H2DCFDA: espermatozoides viables con formación de radicales libres del oxígeno.

### 3.3.4. Análisis de las subpoblaciones espermáticas

Con los objetivos de identificar la distribución de las subpoblaciones presentes en el semen congelado/descongelado de carneros de alta y baja fertilidad y de evaluar el efecto del agregado de PPSiE obtenida con VA y EE en estación reproductiva y fuera de estación sobre estas subpoblaciones, se realizó un análisis multivariado de clusters a partir de los datos de movilidad obtenidos con el sistema CASA. Inicialmente las muestras de semen criopreservado de carneros de alta y baja fertilidad (sin la aplicación de ningún tratamiento) fueron analizadas para detectar las diferencias en la distribución de subpoblaciones. Luego, se evaluó el efecto del tratamiento (PPSiE o PS colectadas con VA o EE) únicamente en espermatozoides de baja fertilidad.

Luego del análisis se pudieron identificar cuatro subpoblaciones en las muestras de semen congelado/descongelado a partir de 55.225 espermatozoides móviles analizados individualmente. Los resultados de las características de movilidad de estas poblaciones se muestran en la tabla 6.

Las diferentes subpoblaciones identificadas con sus correspondientes características se pueden describir de la siguiente manera:

La subpoblación 1 (CL1) estuvo representada por espermatozoides con elevada velocidad (VCL, VSL y VAP) y movilidad progresiva, inferida por los elevados valores de LIN. Además, el valor de ALH fue el menor de todas las subpoblaciones, indicando un patrón de movimiento de baja ondulación. Esta población incluyó el 68,1% del total de espermatozoides.

La subpoblación 2 (CL2) se conformó de espermatozoides activos, sin movilidad progresiva, indicado por los elevados valores de VCL y ALH, junto con bajos LIN y STR, y moderado BCF. Esta población puede ser considerada como hiperactivada. El 10,9% del total de los espermatozoides móviles fueron asignados a esta población.

La subpoblación 3 (CL3) incluyó el 14,3% y estuvo representada por espermatozoides con elevada velocidad y vigor, indicado por los valores de VAP, VCL, VSL y BCF. Esta población registró elevada movilidad progresiva, indicada por los valores de LIN y ALH.

La subpoblación 4 (CL4) estuvo conformada por células con poca movilidad y no progresiva, indicado por los bajos valores de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, junto con bajos LIN, STR y WOB e incluyó el 6,7% del total de la población espermática.

Al comparar la distribución de las poblaciones entre carneros de alta y baja fertilidad se encontraron diferencias significativas en la distribución de la subpoblación compuesta por espermatozoides con movimiento rápido y no lineales (CL2) y en la subpoblación compuesta por espermatozoides con movimiento lento y no lineal (CL4) (fig. 14). La denominada CL2 fue más abundante en las muestras seminales de carneros con menor fertilidad y la denominada CL4 fue más abundante en las muestras seminales de carneros con mayor fertilidad (fig. 14; tabla 9 anexo). No detectamos diferencias significativas para las subpoblaciones compuestas por espermatozoides rápidos de movimiento lineal (CL1) ni para los espermatozoides muy rápidos y lineales (CL3).

La evaluación del efecto del agregado de PPSiE o PS se analizó únicamente para las muestras seminales de carneros de menor fertilidad ya que el objetivo fue

evaluar si la adición de proteínas o de PS podría mejorar la calidad del semen y, en consecuencia, su capacidad fecundante.

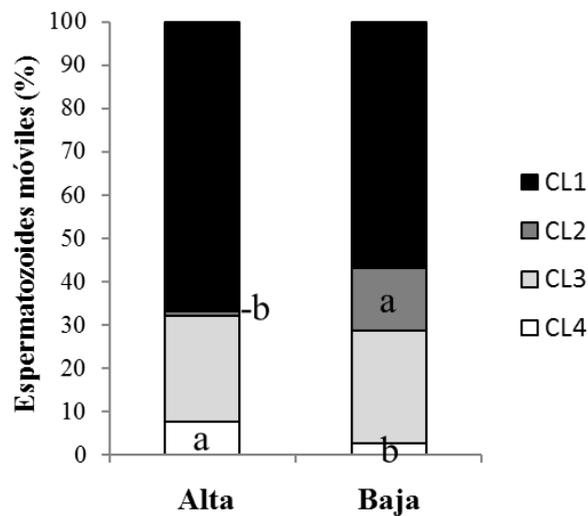
Se detectó un efecto de la interacción entre la estación de colecta y el tratamiento (PPSiE o PS obtenidos por VA o EE) para la distribución de las cuatro subpoblaciones y por este motivo se analizaron de manera separada las estaciones de colecta. El análisis del efecto del tratamiento sobre la distribución de las subpoblaciones CL1, CL2, CL3 y CL4 (Fig. 14) reveló que la proporción de la población con mayor velocidad y progresividad (CL1) fue mejorada luego de la adición de PS colectado con VA en ambas estaciones (fig. 15, tablas 10 y 11 anexo). Contrariamente, la adición de PPSiE colectada con EE durante ambas estaciones ocasionó una disminución de esta subpoblación. La adición de PS colectados con EE fuera de la estación reproductiva no tuvo ningún efecto, sin embargo, el agregado de PS de EE colectado en otoño ocasionó una disminución de esta población (figura 15, tablas 10 y 11 anexo).

Con respecto a la población de espermatozoides considerados "hiperactivados" (CL2), el menor porcentaje se encontró en el grupo control (fig. 15, tablas 10 y 11 anexo). La subpoblación 3 se vio aumentada luego de la adición de PS y PPSiE colectados mediante EE (figura 15, tablas 10 y 11 anexo). No hubo diferencias entre el grupo control y el grupo tratado con PPSiE colectadas con VA y esta subpoblación estuvo ausente en los tratamientos suplementados con PS recogido con VA de ambas estaciones (figura 15). La proporción de espermatozoides de baja movilidad y no progresivos (CL4) no tuvo diferencias entre el control y los tratamientos con PS colectado con VA y EE de estación reproductiva. Los tratamientos suplementados con PPSiE colectada con EE durante la estación no reproductiva y el tratamiento control tuvieron la menor proporción de espermatozoides móviles en este grupo (fig. 15, tablas 10 y 11 anexo).

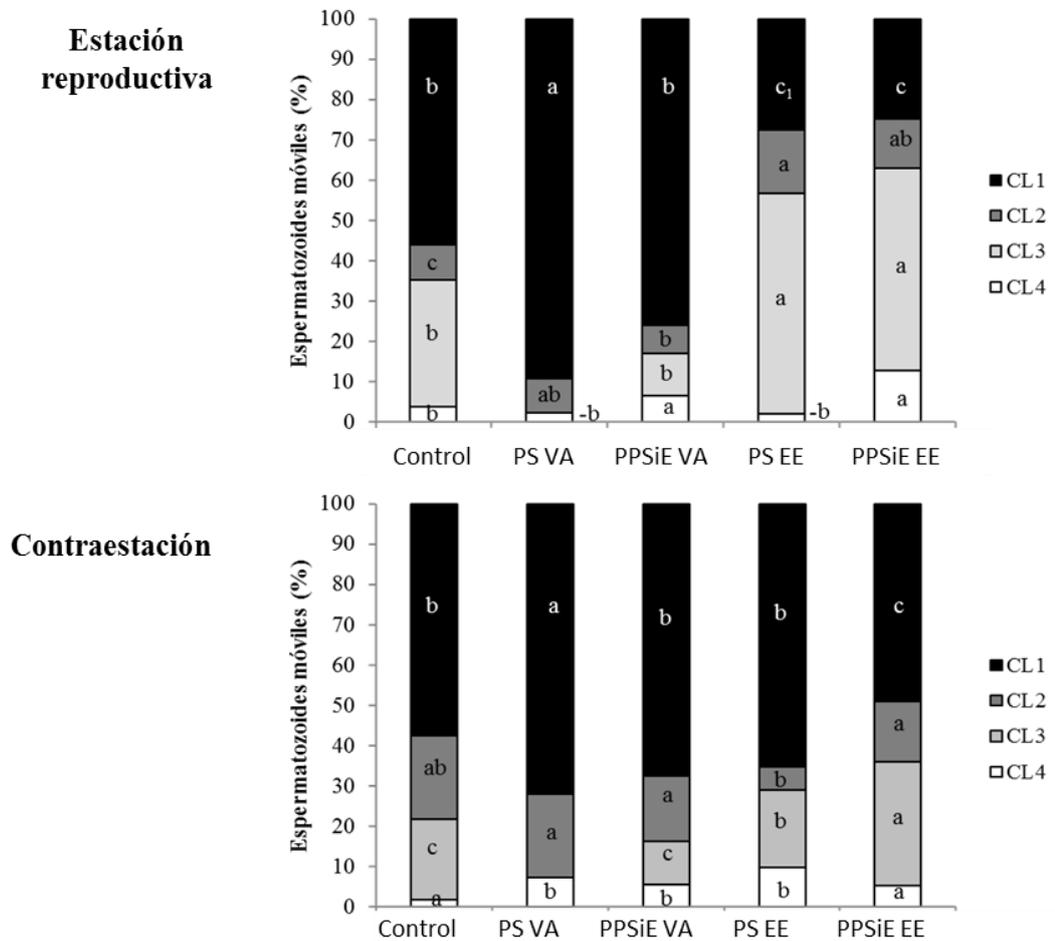
**Tabla 6.** Variables cinemáticas de las subpoblaciones espermáticas (CL) definidas en semen ovino congelado/descongelado (media  $\pm$  DE)

Variable	CL1	CL2	CL3	CL4
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	124,9 $\pm$ 45,2	112,6 $\pm$ 60,1	189,8 $\pm$ 40,7	39,8 $\pm$ 21,0
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	100,1 $\pm$ 42,9	33,4 $\pm$ 30,6	129,0 $\pm$ 47,8	11,0 $\pm$ 7,0
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	110 $\pm$ 41,1	72,0 $\pm$ 54,4	138,8 $\pm$ 42,6	23,2 $\pm$ 11,5
LIN (%)	82,7 $\pm$ 10,2	36,4 $\pm$ 22,1	70,7 $\pm$ 15,4	30,3 $\pm$ 16,6
STR (%)	94,5 $\pm$ 4,8	56,9 $\pm$ 24,5	94,8 $\pm$ 4,4	53,6 $\pm$ 21,7
WOB (%)	88,7 $\pm$ 7,6	70,9 $\pm$ 18,1	75,9 $\pm$ 12,5	61,3 $\pm$ 17,0
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,6 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,4
BCF (Hz)	23,6 $\pm$ 6,9	15,0 $\pm$ 10,4	27,6 $\pm$ 7,2	6,0 $\pm$ 4,3

CL1: rápidos/progresivos/lineales; CL2: rápidos/no-lineales; CL3: muy rápidos /ondulatorios/lineales; CL4: lentos/no-lineales; VCL: velocidad curvilínea velocidad curvilínea; VSL: velocidad en línea recta; VAP: velocidad promedio; LIN: linealidad; STR: rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: frecuencia de batido.



**Figura 15.** Distribución de subpoblaciones espermáticas (CL) en semen criopreservado de carneros de alta y baja fertilidad; Subpoblación 1, barra negra; Subpoblación 2, barra gris oscuro; Subpoblación 3, barra gris claro; Subpoblación 4, barra blanca; Letras diferentes dentro de las barras (a–c) indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para la misma subpoblación entre carneros de alta y baja fertilidad.



**Figura 16. Distribución de las subpoblaciones espermáticas entre tratamientos (CLs);** Subpoblación 1, barra negra; Subpoblación 2, barra gris oscuro; Subpoblación 3, barra gris claro; Subpoblación 4, barra blanca. Letras diferentes dentro de las barras (a–c) indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en las subpoblaciones entre tratamientos: PS VA (plasma seminal colectado con vagina artificial); PPSiE VA (proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides obtenida con vagina artificial); PS EE (plasma seminal colectado con electroeyaculador); PPSiE EE (proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides obtenida con electroeyaculador), control; Durante estación reproductiva y en contraestación.

### 3.4. DISCUSIÓN

Los estudios realizados en la primera experiencia demostraron que el protocolo de obtención de PPSiE fue más efectivo y más sencillo que el desarrollado por Bernardini *et al.* (2011), ya que nos permitió la obtención de una PPSiE con mayor concentración proteica (4 mg/ml) y compuesta por las mismas proteínas consideradas crioprotectoras (RSVP14 y RSVP20). Sin embargo, cuando evaluamos el efecto de su agregado a los espermatozoides luego de la congelación/descongelación sobre la movilidad a tiempo variable no se obtuvieron mejoras respecto al control tanto en la movilidad total como en la progresiva e incluso causó la disminución de las demás variables estimadas con el sistema CASA. Contrariamente, el agregado de PS obtenido con VA y EE ocasionó una mejora de estas variables con respecto al control. Como fue mencionado anteriormente, el efecto benéfico del PS sobre espermatozoides criopreservados responde a sus componentes proteicos, e hipotetizamos que en este ensayo es posible que el efecto de las PPSiE haya quedado enmascarado por el método empleado para el lavado de las gametas previo a la suplementación con PPSiE, el cual haya sido insuficiente y permitido que algunas proteínas del PS del eyaculado quedaran adheridas a la membrana espermática. Por lo tanto, en los ensayos de la segunda estancia reemplazamos el uso de lana de vidrio por un medio de lavado en gradiente con Androcol-OTM<sup>®</sup>. El uso de Androcol ha sido ampliamente estudiado en equinos, caprinos, ovinos y cerdos y se ha observado que permite obtener una población espermática móvil, libre de PS y de diluyente de criopreservación (Morrel *et al.*, 2009; Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012; Anel-López *et al.*, 2015).

Cuando evaluamos el efecto de las PPSiE colectadas con VA y EE en estación reproductiva y fuera de ella, sobre espermatozoides con diferente grado de fertilidad a tiempo fijo, pudimos observar que nuevamente la adición de PPSiE no tuvo efecto sobre la movilidad total y progresiva. Más aún, ocasionó disminución de las variables de velocidad curvilínea (VCL), como en línea recta (VSL) y en consecuencia de la velocidad media (VAP). Contrariamente, tanto la movilidad total como la progresiva mejoraron mediante la adición de PS completo y estos efectos fueron independientes del método de colecta del mismo. Sin embargo, el hecho de haber encontrado que las muestras control tenían valores más altos de VSL y VCL en comparación con los espermatozoides incubados con PPSiE podría hacernos pensar que estas proteínas tienen un efecto decapacitante, ya que las células capacitadas frecuentemente

presentan un movimiento vigoroso/no progresivo en asociación con el proceso de hiperactivación, fenómeno visto durante la capacitación. Aunque Mortimer y Maxwell (1999) expusieron que los espermatozoides de carnero con hiperactividad también deberían mostrar otros parámetros afectados como una linealidad inferior al 30% y un valor máximo de 9,0  $\mu\text{m}$  en el desplazamiento lateral de la cabeza, que no fueron observados en este trabajo.

El estudio mediante análisis multivariado de los datos correspondientes a la movilidad espermática nos permitió detectar la presencia de cuatro subpoblaciones, que se vieron afectadas de forma diferencial por el agregado de PS o de PPSiE. Si bien es cierto que se ha avanzado significativamente en los últimos años en el análisis de subpoblaciones de espermatozoides móviles facilitados por la tecnología CASA en especies como toros, caballos, gacelas, jabalíes y ciervos (Abaigar *et al.*, 1999; Abaigar 2001; Quintero-Moreno *et al.*, 2003; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Martínez-Pastor *et al.*, 2005; Muiño *et al.*, 2008; Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2009; Mata-Campuzano *et al.*, 2012), pocos estudios se han enfocado en el estudio de espermatozoides ovinos criopreservados (Bravo *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2017). La característica más llamativa de este enfoque estadístico es que se opone muchas veces a los resultados provenientes del análisis del conjunto de datos a través de los valores medios ( $\pm$  desviaciones estándar). El examen de los datos típicos de CASA suele mostrar que la distribución estadística "normal" es rara, enmascarando los efectos del tratamiento debido a que las desviaciones estándar son demasiado altas como para permitir su detección mediante pruebas estadísticas basadas en la varianza. Este problema puede explicarse en parte a que un eyaculado es una mezcla heterogénea debido a la existencia de subpoblaciones de espermatozoides, lo que significa que incluso si algunas subpoblaciones se ven afectadas por un tratamiento, existen otras que no responden y que coexisten en la misma muestra (Holt *et al.*, 1985; Harrison *et al.*, 1996; Martínez-Pastor *et al.*, 2011). Por lo tanto, el desafío reside en comprender las diferencias entre las distintas subpoblaciones y su importancia biológica, particularmente en muestras criopreservadas. Estas diferentes subpoblaciones podrían ser células que responden de manera diferente a la criopreservación, y también podrían estar relacionadas con diferencias en la fertilidad.

Para comprender la contribución relativa de cada subpoblación a la fertilidad, como parte de los objetivos de este capítulo comparamos espermatozoides

criopreservados de carneros con diferente grado de fertilidad probada y observamos que los de baja fertilidad mostraron una mayor proporción de espermatozoides considerados hiperactivados (CL2). Si bien es cierto que la movilidad espermática masal de espermatozoides ovinos frescos está positivamente correlacionada con la tasa de preñez (David *et al.*, 2015), se desconoce la relación entre las características de la movilidad posdescongelación y la fertilidad. Hipotetizamos que el semen de carneros de baja fertilidad contiene una subpoblación de espermatozoides que luego de la descongelación, sufre hiperactivación causada por la criocapacitación y resulta en una mayor proporción de células de vida media escasa, ocasionando bajas tasas de preñez cuando se lo utiliza en una IA. Además, observamos que los eyaculados criopreservados de carneros de alta fertilidad presentaron una mayor proporción de espermatozoides lentos y no lineales (CL4) sin mostrar diferencias con los de baja fertilidad en las poblaciones compuestas por espermatozoides de elevada velocidad. Esto demostró que el semen congelado-descongelado de carneros de alta fertilidad no solo tiene una menor proporción de espermatozoides "criocapacitados" sino que, después de cierto período de incubación, una fracción de células "sanas" sufre una caída en la velocidad cambiando de clúster C1 a C4, pero tal vez todavía mantienen su capacidad de fecundar. El concepto clave detrás de esta observación, según Martínez-Pastor *et al.* (2005) es la hipótesis de que un espermatozoide altamente móvil no perdería su movilidad repentinamente (a menos que experimentara un daño extenso debido al choque osmótico), sino que sería un proceso progresivo. En otras palabras, los espermatozoides clasificados como CL1 y CL3, altamente móviles, perderían su movilidad más o menos rápidamente, pero gradualmente, y eventualmente se clasificarían como espermatozoides CL4; luego se volverían lo suficientemente lentos como para ser considerados inmóviles. En este sentido, aunque nuestros resultados de calidad en base a la movilidad posdescongelación no permite determinar de manera concluyente si la muestra es capaz de fecundar o no, podrían ser un buen indicador de que la muestra seminal proveniente de machos de alta fertilidad tiene mejores características que las provenientes de carneros de baja fertilidad.

Teniendo en cuenta el efecto decapacitante demostrado para las proteínas del PS (Barrios *et al.*, 2000) y que la composición del PS cambia con la estación y el método de colecta (Pérez-Pe *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2008), como fue detallado anteriormente, nos propusimos re analizar el efecto de la adición de PPSiE obtenida con VA y EE en estación reproductiva y fuera de estación y compararlo con la adición

de PS obtenido en las mismas condiciones, pero a diferencia de lo realizado anteriormente no se trató a la muestra seminal como una única población sino que se la diferenció en subpoblaciones basándonos en sus características de movilidad y observamos interacción entre el tratamiento y la estación de colecta en todos los casos. También encontramos diferencias según el método de colecta, a diferencia de lo que habíamos observado previamente.

Después de una hora de incubación, la subpoblación más abundante en todos los tratamientos fue la CL1, conformada por espermatozoides rápidos y lineales. La adición de PS colectado por VA en ambas estaciones ocasionó un aumento en esta población. Esos espermatozoides, junto con los correspondientes a CL3 (movimiento muy rápido y lineal), podrían ser los más fértiles, ya que la movilidad progresiva se ha correlacionado fuertemente con el potencial fecundante (Donnelly *et al.*, 1998). Sin embargo, la adición de PS colectado por VA eliminó la subpoblación 3. En la misma dirección, la adición de PS, así como de PPSiE obtenida por EE, produjo un aumento en la proporción de CL3. Con el enfoque en el efecto del PS colectado en estación reproductiva, el aumento en la población CL3 ocurrió junto a una caída en la subpoblación CL4 (baja velocidad, baja linealidad). Este resultado coincide con lo observado, luego de la adición de PS y de PPSiE redujo la señal de fosforilación provocada por la criocapacitación.

A partir de todo lo comentado hasta aquí, es interesante notar que cuando solo consideramos los valores medios de los parámetros de CASA, en lugar de discriminar entre las diferentes subpoblaciones de espermatozoides no pudimos detectar efectos significativos de la adición de PPSiE colectado por VA o EE sobre la movilidad. Sin embargo, cuando discriminamos por poblaciones ocurrió todo lo contrario, esto resalta los inconvenientes que pueden ocasionar ignorar la variabilidad de las muestras seminales. Entonces a partir de estos últimos resultados podemos pensar nuevamente en una aplicación biotecnológica de las proteínas del PS para mejorar la calidad y capacidad fecundante del semen ovino criopreservado

Al evaluar el efecto de la suplementación con PPSiE a espermatozoides congelados sobre parámetros fisiológicos medidos con citometría de flujo (viabilidad, permeabilidad de la membrana plasmática, funcionalidad mitocondrial), observamos que no tuvo efectos significativos en comparación con las muestras control. Mientras que, la adición posdescongelación de PS completo causó los mejores valores en estos parámetros, en oposición a lo reportado por Bernardini *et al.* (2011) que demostraron

que la membrana espermática fue mejorada luego de un período de incubación de 15 min con PPSiE obtenida por VA. Para la población de espermatozoides viables con permeabilidad de membrana normal (YO-PRO-1-/PI-), también se detectó un mayor efecto de PS colectado por VA que PS recogido por EE, en contraste con lo esperado, según los datos arrojados en el capítulo II. Adicionalmente, no se observaron diferencias entre las estaciones de colecta del PS y de las PPSiE, en oposición a lo esperado. A diferencia de muchas especies domésticas, los ovinos son animales de marcada estacionalidad en su actividad reproductiva y el ciclo anual del fotoperiodo ha sido identificado como el factor determinante de este fenómeno. Se los llama fotoperiódicos negativos ya que su temporada reproductiva comienza cuando los días de acortan y esto depende de la latitud a la cual los animales se encuentren. En nuestra latitud la estación reproductiva corresponde al otoño. El fotoperiodo influencia la producción hormonal, causa cambios en el peso de los testículos, en el volumen seminal y en la libido (Haynes; Schanbacher, 1983). Colas y Brice (1976) observaron que la fertilidad del semen luego de una IA fue mayor luego de utilizar semen colectado en la estación reproductiva en comparación con el resto del año, esto se ha relacionado con cambios en la composición proteica y proteínas totales en el PS (Smith *et al.*, 1999). Esto sugiere que las proteínas del PS pueden influir en la resistencia estacional de los espermatozoides al daño debido a la congelación-descongelación. En un trabajo realizado por Leahy *et al.* (2010) se observó que el efecto crioprotector del PS fue mayor cuando este se obtuvo durante la estación reproductiva. Adicionalmente, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, Domínguez *et al.* (2008) demostraron que la adición de PS colectado en otoño e invierno mejoró la movilidad espermática luego de su agregado posdescongelación. Esto estaría relacionado al contenido de las proteínas RSVP14 y RSP20, Cardozo *et al.* (2006) detectaron cambios en la concentración de estas a lo largo del año, observándose una mayor proporción durante la temporada reproductiva.

En este estudio tampoco se observaron efectos diferenciales del agregado de PS o PPSiE a espermatozoides pertenecientes a reproductores con alto y bajo grado de fertilidad. Se ha hipotetizado que reproductores con diferente grado de fertilidad tienen una composición proteica diferencial en su PS lo que podría contribuir a esta diferencia. En este sentido, Brandon *et al.* (1999) encontraron una correlación positiva entre la presencia de una proteína de 71 kDa y elevada fertilidad en equinos y Yue *et al.* (2009) observaron que ocho proteínas con pesos moleculares comprendidos en el rango 15,13-116,20 kDa presentaron concentraciones diferentes en el PS de carneros

con alta y baja fertilidad. Estas diferencias presentes en el medio en el que se encuentran los espermatozoides de diferente fertilidad afectarían la respuesta espermática posdescongelación al agregado de PS o de sus proteínas. Sin embargo, esto no fue detectado en el presente estudio.

Luego de evaluar el efecto de las PPSiE colectadas con VA y EE en estación reproductiva y fuera de ella, sobre espermatozoides con diferente grado de fertilidad a un tiempo fijo de 60 minutos post-incubación, observamos que la señal inducida por la fosforilación de proteínas pudo ser revertida luego de su adición a los espermatozoides, en concordancia a lo ocurrido luego de la adición de PS. Uno de los eventos moleculares claves en la capacitación inducida por la criopreservación, también llamada criocapacitación, es la fosforilación de proteínas. La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos regulatorios que controla diversos procesos celulares (Hunter, 2000; Pawson, 2004). En espermatozoides los residuos de serina/treonina como los de tirosina experimentan fosforilación. Sin embargo, el único indicador infalible de capacitación espermática es la fosforilación en tirosina. Muchos estudios han demostrado que la inhibición de su fosforilación bloquea la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la fecundación *in vitro* (Roberts *et al.*, 2003; Urner *et al.*, 2001; Visconti, 2009). Satorre *et al.* (2007) demostraron que la adición de plasma seminal revertía esta señal de fosforilación en espermatozoides de equinos y porcinos. Adicionalmente, Pérez-Pé *et al.* (2002) demostraron que cuando espermatozoides ovinos capacitados eran expuestos a las proteínas contenidas en el PS se revertía la capacitación, evidenciándose por la disminución de la señal de fosforilación de las proteínas de peso molecular de 45, 40 y 30 kDa. En el presente trabajo, se observó que la adición de PS completo obtenido con VA y EE, y más aún, que la adición únicamente de PPSiE fue suficiente para disminuir la fosforilación de las proteínas de 45 y 40 kDa. Esto es consistente con lo expuesto en el capítulo II donde demostramos que tanto el PS como las PPSiE contienen entre sus proteínas a RSVP14 y RSVP20, Barrios *et al.* (2005) demostraron que estas fueron capaces de prevenir e incluso de revertir los cambios tipo capacitación en los espermatozoides sometidos a *cold-shock*. Este hallazgo sugiere que el agregado únicamente de la PPSiE podría ser suficiente para revertir las señales moleculares de la capacitación causada por la criopreservación, tal vez actuando a través de la inhibición de la señal de transducción en la vía de la capacitación.

Las proteínas RSVP14 y RSVP20 pertenecen a la familia de proteínas con doble dominio de fibronectina tipo II (FN-II). Estas tienen en común la presencia de

una estructura compuesta por dos dominios de fibronectina en tándem. Estas proteínas también han sido llamadas BSP y son las proteínas más abundantes en el PS de bovinos y ovinos (Manjunath, 1984). Se han realizado estudios biofísicos en las proteínas de bovino llamadas BSP-A1/A2 (también conocidas como PDC-109) para intentar comprender el mecanismo de interacción con la membrana plasmática del espermatozoide (Müller *et al.*, 2002; Calvete; Sanz, 2006; Damai *et al.*, 2009) y se observó que cada dominio reconoce una molécula de colina sobre la membrana espermática. Por otro lado, Manjunath y Thérien (2002) propusieron que la interacción de las BSP con los fosfolípidos del tipo colina de la membrana plasmática del espermatozoide prevendría el movimiento libre de los mismos, estabilizándolos (estado no capacitado). Sin embargo, durante el tránsito del complejo espermatozoide-proteína BSP por el tracto genital de la hembra, los mismos autores propusieron la ocurrencia de una modificación de los lípidos y, por ende, una reorganización de las membranas y aparición de nuevos receptores para las HDL promoviendo el comienzo de la capacitación (Thérien *et al.*, 1999). De esta manera, decrece la relación colesterol/fosfolípidos lo que sería un evento esencial para que los espermatozoides comiencen la reacción acrosómica y eventualmente fertilicen el ovocito. La liberación de colesterol, altera la relación colesterol/fosfolípidos, desestabilizando las membranas espermáticas e iniciando las vías de transducción que regulan la expresión de receptores para proteínas de la zona pelúcida en la superficie espermática, habilitando el inicio a la reacción espermática (Benoff, 1993). Los procesos mediados por las BSPs que llevan a la capacitación espermática sugieren que diferencias detectadas en sus concentraciones en el PS pueden influenciar la fertilidad (Moura *et al.*, 2006). Sólo los espermatozoides completamente capacitados son competentes para atravesar la reacción acrosómica y fecundar un ovocito. Sin embargo, la vida media de los espermatozoides capacitados es más corta que la de los recién eyaculados (Holt y Medrano, 1997; Bailey *et al.*, 2000). Por lo tanto, es muy importante que la capacitación y la ovulación ocurran en un marco temporal-espacial adecuado. Los espermatozoides crio-capacitados tienen una capacidad reducida de interactuar con el epitelio oviductal, exhibiendo tasas metabólicas elevadas y aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana. Experimentan reacción acrosómica espontánea debido a una afluencia incontrolada de  $Ca^{++}$  y pierden su capacidad fecundante antes de alcanzar el oviducto. La crio-capacitación produciría entonces una subpoblación de espermatozoides con una vida útil reducida in vivo, reduciendo las probabilidades de fecundar. Asimismo, es muy importante que estas proteínas decapacitantes puedan

ser removidas de la membrana de la célula espermática para fecundar con éxito un ovocito. A partir de los resultados obtenidos no podemos confirmar cuánto tiempo se retrasa la capacitación luego de la suplementación con PPSiE y si este efecto pueda ser revertido. Con el fin de proponer un uso biotecnológico para las PPSiE sería importante que la capacitación pueda retrasarse hasta que el espermatozoide alcance el oviducto e interactúe con las secreciones del tracto genital femenino.

Hasta aquí, tomando todos los resultados juntos podemos decir que, aunque el agregado de PPSiE tiene un claro efecto decapacitante, incluyendo la capacidad de revertir la fosforilación de tirosina debido a la crio-capacitación, no son suficientes para emular los efectos del PS completo con respecto a los parámetros funcionales del espermatozoide. La concentración de proteínas o el tiempo de incubación podría requerir un ajuste, para permitir una buena interacción de las proteínas con los espermatozoides.

## **Capítulo IV.**

# **Producción recombinante de un péptido con dominios de fibronectina y evaluación de su efecto sobre los daños ocasionados por la criopreservación**

## 4.1. INTRODUCCIÓN

### PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES

Como fue demostrado en el capítulo dos de esta tesis, el PS colectado por VA como por EE, tiene la capacidad de revertir los daños ocasionados por la criopreservación (movilidad, permeabilidad e integridad de membrana plasmática, actividad mitocondrial, producción de radicales libres y criocapacitación). Parte de esta actividad del PS se debe a la fracción de proteínas que interactúa con las proteínas de la membrana espermática (PPSiE). Esta fracción, se compone principalmente por dos proteínas denominadas por su origen y peso molecular como RSVP14 y RSVP20 (*ram seminal vesicles proteins*), cuya función crioprotectora ha sido ampliamente reportada (Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pé *et al.*, 2001). Como fue mencionado anteriormente, estas proteínas pertenecen a la familia de las proteínas BSP, cuya principal característica es la presencia en tándem de dos dominios de fibronectina tipo II (Fn-II). Este dominio interactúa con fosfolípidos presentes en las membranas espermáticas. Thérien (2002) propusieron que la interacción dominio-fosfolípido prevendría el movimiento libre de los espermatozoides estabilizándolos (estado no capacitado). Sin embargo, debido a que tanto la concentración, como la capacidad para proteger a los espermatozoides de RSVP14 y RSVP20 varía según la estación reproductiva (Pérez-Pé *et al.*, 2001), se ha trabajado en el desarrollo de protocolos para producir estas proteínas *in vitro*. La producción *in Vitro* en *E. coli* presenta las ventajas de un buen rendimiento en corto tiempo y con bajo costo de producción. Sin embargo, la problemática que se plantea es que la expresión de algunas proteínas correctamente plegadas es compleja debido a la presencia de puentes disulfuro en su estructura. Esto ocasiona una estructura secundaria y terciaria inadecuadas por defectos en el plegado, los cuales pueden afectar la solubilidad de la proteína dentro de la célula, y en consecuencia producir su agregación en cuerpos de inclusión (Wilkinson; Harrison, 1991). Se han probado diferentes sistemas de expresión alternativos en levaduras e insectos. Un grupo de investigación, logró expresar RSVP20 en *E. coli* (Serrano *et al.*, 2013) y RSVP14, tanto en *E. coli* como en extractos celulares de insecto (Serrano *et al.*, 2015) y comprobaron la unión a espermatozoides únicamente de la proteína recombinante RSVP20. Sin embargo, hasta la fecha no han evaluado el efecto de ninguno de estos dos péptidos recombinantes sobre los espermatozoides. Dadas las

propiedades de unión reportadas para el dominio FN-II a glicosaminoglicanos, fosfolípidos con colina, lipoproteínas de alta y baja densidad (Therien *et al.*, 2005), hipotetizamos que la capacidad del PS, y más aún de las proteínas crioprotectoras del PS, estaría dada por la presencia de estos dominios. El clonado y expresión *in vitro* de este dominio sería una herramienta biotecnológica muy útil para preservar la calidad y potencial fecundante del semen ovino congelado.

La producción de proteínas recombinantes resulta una herramienta indispensable cuando se requiere acumular material en cantidad como para realizar estudios de funcionalidad, así como para su uso en procesos biotecnológicos con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales. El primer paso es clonar el ADNc apropiado para, posteriormente, producir las proteínas utilizando un sistema de expresión adecuado entre la gran variedad que se encuentran disponibles (revisado por (Demain; Vaishnav, 2009; Berlec; Strukelj, 2013). Actualmente las proteínas pueden expresarse en cultivos celulares de bacterias, levaduras, hongos, mamíferos, plantas e insectos, o vía plantas y animales transgénicos.

El principal factor a tener en cuenta es el tipo de proteína, sus características, sobre todo la presencia de modificaciones post-traduccionales, pero también hay que considerar la cantidad, velocidad y costo de producción. El 80% de las proteínas recombinantes expresadas ha sido producido en la enterobacteria *Escherichia coli*, ya que esta bacteria ha sido muy bien caracterizada desde el punto de vista genético y fisiológico (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). La primer y quizás más famosa proteína recombinante producida por esta bacteria es la hormona insulina humana. La principal ventaja de estos sistemas es su bajo costo y elevado nivel de producción y la principal desventaja es la incapacidad de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales que a veces son necesarias para el correcto funcionamiento de una proteína. Cuando se requieren estas modificaciones los sistemas de producción elegidos son las células de insecto o de mamífero. Estos cultivos son más caros, complejos, producen menor cantidad de proteína y requieren más especialización. Debido a las ventajas que presenta el uso de *E.coli*, se han introducido diferentes estrategias para solucionar los problemas que presenta expresar proteínas eucariotas en este sistema (Berlec; Strukelj, 2013; Gopal; Kumar 2013).

Uno de los principales problemas que se debe superar cuando se trabaja con dicha bacteria, es la acumulación de la proteína recombinante en cuerpos de inclusión. Su formación depende de la estructura primaria de la proteína, principalmente de la

presencia de regiones hidrofóbicas, observándose principalmente cuando la proteína contiene puentes disulfuro que no se han formado correctamente (Wilkinson; Harrison, 1991). La mayoría de las proteínas recombinantes se expresan en el citoplasma bacteriano, que es un ambiente reductor. Las cepas modificadas para no producir la enzima tioredoxina reductasa (*trxB*) o la glutatión reductasa (*gor*) vuelven el citoplasma ligeramente oxidante permitiendo de esta manera la formación de puentes disulfuro en el citoplasma (Stewart *et al.*, 1998; Berkmen, 2012). Las *E. Coli* Origami suelen elegirse para producir proteínas que requieren puentes disulfuro porque son tanto *trxB* como *gor* negativas (Bessette *et al.*, 1999). Si bien la formación de cuerpos de inclusión puede ser ventajosa ya que las proteínas de interés se encuentran a una alta concentración, puras y protegidas de las proteasas, se presenta el inconveniente de que se debe crear un protocolo de solubilización y replegamiento particular para cada proteína para recuperarlas de manera funcional (Burgess, 2009; Basu *et al.*, 2011). La mayor parte de estos protocolos se basan en la adición y posterior eliminación de altas concentraciones de agentes caotrópicos (urea, cloruro de guanidina, tiocianato de guanidina), detergentes (sodium dodecyl sulphate, sarkosyl, TritonX 100) y agentes reductores (ditiotreitrol, ditioeritrol, cisteína) (Singh; Panda, 2005; Singh *et al.*, 2015). Otro factor a tener en cuenta es el plásmido en el que se introduce la información genética de la proteína recombinante. Existen plásmidos capaces de añadir péptidos a la proteína (tags) que generalmente aumentan la expresión y ayudan a formar puentes disulfuro para que la proteína se pliegue correctamente y mejore su solubilidad. Otros tags facilitan la purificación de la proteína ya que se pueden usar para purificar por cromatografía de afinidad (Gopal; Kumar, 2013). En algunos casos, los plásmidos pueden contener regiones que codifican para algunas proteínas, generando proteínas de fusión que en algunos casos aumentan la expresión de la proteína de interés y ayudan a formar puentes disulfuro para que la proteína se pliegue correctamente y mejore su solubilidad, tal es el caso de la Tiorredoxina (*trxA*) (LaVallie *et al.*, 1993).

En nuestro grupo de investigación, Zalazar *et al.* (2015) produjeron una molécula recombinante denominada SPINK3, homóloga de la vesícula seminal ratón y que se secreta hacia el PS. Se demostró la capacidad de SPINK3 no solo de unirse a espermatozoides ovinos congelados/descongelados, sino también de mejorar su movilidad y de revertir la capacitación ocasionada por la criopreservación. Sin embargo, aún no ha sido evaluado su efecto sobre la capacidad fecundante.

**Objetivos particulares de este capítulo**

- Obtener el ADNc correspondiente a las proteínas diferenciales obtenidas con ambos métodos y clonarlos en un vector de expresión para obtener las proteínas recombinantes.
  
- Analizar el efecto del agregado de estas proteínas recombinantes al medio de descongelación sobre los parámetros seminales y capacidad fecundante de los espermatozoides ovinos.

## **4.2. MATERIALES y MÉTODOS**

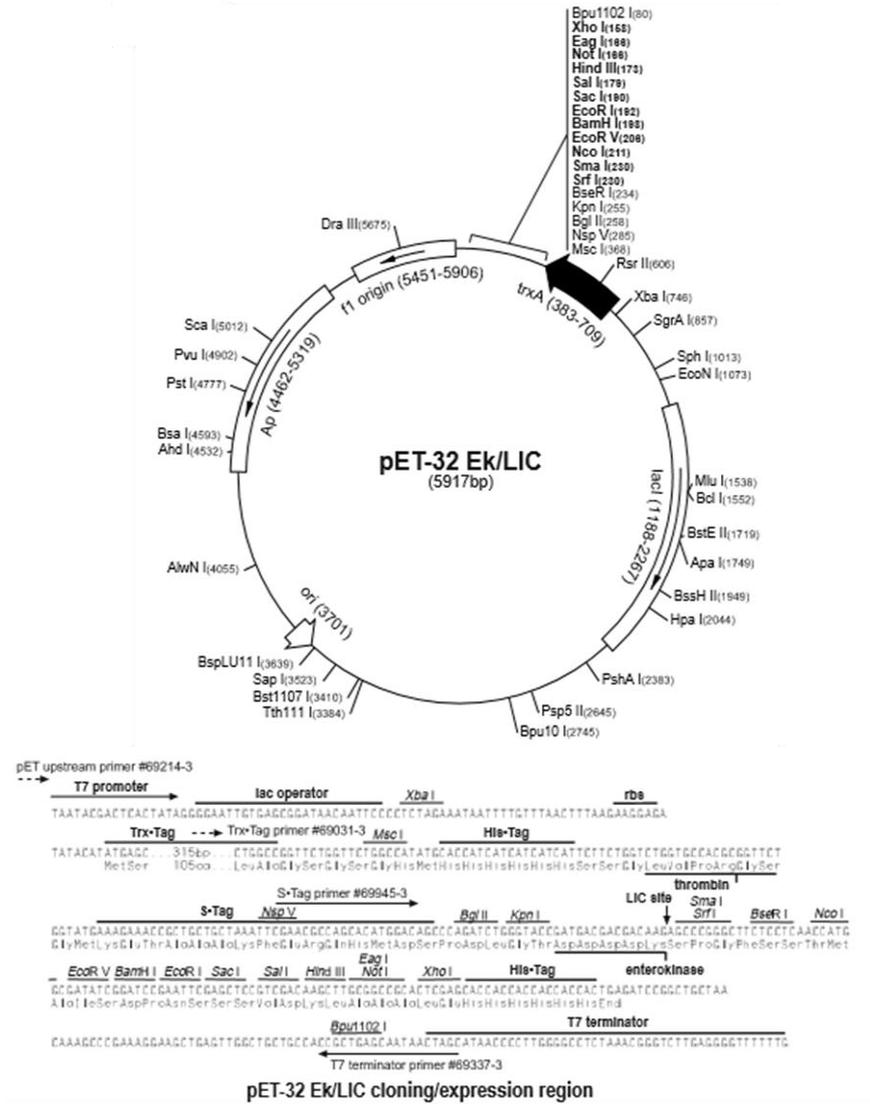
### **4.2.1. Lugar y período experimental**

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB)-CONICET, Universidad Nacional de Mar del Plata, y en el laboratorio de producción de embriones *in vitro* del grupo de biotecnología de la reproducción INTA Balcarce, en el período junio del año 2016 a noviembre del 2017.

### **4.2.2. Producción de la proteína recombinante**

#### **4.2.2.1. Preparación ADNc para la expresión de la proteína recombinante**

Se utilizó como templado una biblioteca de ADNc de epidídimo bovino donde se expresa la proteína EPIDIDYMAL SPERM BINDING PROTEIN 1 (ELSPBP1) que contiene 4 dominios FN-IIen tándem construida sobre el vector pDONR<sup>TM</sup>222 (Gateway) por medio de la estrategia CloneMiner (Invitrogen). La biblioteca se construyó en el LRDT, Gamet Biology Section, NIEHS, NIH (2008). El vector seleccionado para el sub-clonado fue el pET-32 Ek/LIC (Novagen), debido a que genera proteínas fusionadas a tiorredoxina, lo que contribuye a aumentar la solubilidad de las mismas en *E. coli*. El vector tiene 5.917 pb, sitios de corte para las enzimas KpnI y XhoI y dos tags de histidina para posteriormente poder purificar la proteína por cromatografía de afinidad de níquel (figura 16).



**Figura 17. Esquema del vector pET-32 Ek/LIC.** Vector empleado para expresar proteínas fusionadas a tiorredoxina.

Se diseñaron cebadores a partir de la secuencia de ADNc que codifica para el fragmento conformado por los cuatro dominios de FN-II de la proteína madura *ELSPBP1*, a los que se denominó primer Fw: 5´-CGGGGTACCTCATGCATCTTTC-3´ el cual contenía el sitio de restricción para KpnI y primer Rv: 5´-CCGCTCGAGGCAGTACAC- 3´, que incluía el sitio de restricción para Xho. La amplificación con este par de primers sobre el ADNc de *ELSPBP1* da un producto de amplificación de 597 pb.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 20 µl, con una mezcla de reacción que contenía: buffer Taq 2x, 200 µM dNTPs, 1,5 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 1 µM

primers Fw y Rv, 0,5 Taq ADN polimerasa (0,5 U/ $\mu$ l) y 5  $\mu$ l de templado (biblioteca conteniendo 9.75 x 10<sup>10</sup> cfu/ml). Las reacciones se realizaron con el siguiente protocolo: una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, un paso de hibridación de los primers a 53 °C por 1 minuto, un paso de elongación de los mismos a 72 °C durante 1 minuto y finalmente un paso de 72 °C durante 7 minutos. En todos los experimentos se incluyó un control negativo que consistió en una mezcla de reacción conteniendo todos los reactivos excepto el templado y un control positivo que consistió en la amplificación del ADNc de  $\beta$ -actina ( $\beta$  ACT-Fw 5'-TTC CGA TGC CCT GAG GCT CTT TTC-3' Y  $\beta$  ACT-Rev 5'- CTT GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3') y 3  $\mu$ l de la biblioteca de epidídimo bovino como templado. Los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa 1% y se visualizaron con Syber safe 1:10000. Los fragmentos amplificados (597 pb) se escindieron del gel y se purificaron empleando el kit Puro I Clean Up (Productos Biológicos®). Se obtuvieron 200 ng totales del producto de amplificación.

#### **4.2.2.2. Amplificación del vector**

El vector fue amplificado en DH5 $\alpha$  transformada con pET-32 Ek/LIC. DH5 $\alpha$  fue multiplicada en medio LB líquido (1% p/v Triptona, 0,5% p/v extracto de levadura y 0,5% p/v NaCl) + ampicilina (1mg/1ml) ON a 37 °C. Posteriormente, el vector fue purificado utilizando un kit comercial (Minielute, Quiagen®). Los productos de la purificación se sembraron en un gel de agarosa 1%. Se obtuvo una concentración del vector de 27 ng/ $\mu$ l en una primera elución y de 21,6 ng/ $\mu$ l en la segunda elución.

#### **4.2.2.3. Digestión del inserto y del vector**

La digestión del inserto y del vector se realizó de forma separada, pero con el mismo procedimiento. Por un lado, se utilizaron 400 ng del ADNc purificado de FN-II x4y por el otro 500 ng del vector pET-32 Ek/LIC, que se colocaron en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo 10 U de la enzima de restricción XhoI (10 U/ $\mu$ l, Fermentas®), buffer R 1X y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, los productos de esta primera digestión se desalinizaron con conos de agarosa 1% y glucosa 100

mM. La segunda digestión se realizó agregando a la reacción 1 µl de la enzima de restricción KpnI (10 U/µl Promega®) y 2 µl de buffer J y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

Los productos de digestión del inserto y del vector se separaron en un gel de agarosa 1,5 % y se visualizaron con Syber Safe. Los fragmentos digeridos se escindieron del gel, en el caso del inserto se purificó con el kit ADN PuriPrep-GP Highway®, obteniéndose una concentración de 70 ng/µl y en el caso del vector utilizando el kit Pure Link (Invitrogen®), obteniéndose una concentración de 14,3 ng/µl.

#### **4.2.2.4. Reacción de ligación y transformación**

Se llevaron a cabo dos ligaciones, con dos relaciones diferentes vector/inserto, 1:3 y 1:5. Se emplearon 50 ng del vector pET-32 Ek/LIC digerido, mientras que de inserto se emplearon 15 ng y 25 ng en cada reacción, respectivamente. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10 µl conteniendo buffer ligasa 1x, enzima T4 ADN Ligasa (3 U/µl, Promega) y ATP (100 mM) y se incubó ON a 18 °C.

El producto de las ligaciones (5 µl de las ligaciones 1:3 ó 7 µl de las ligaciones 1:5) se utilizó luego para amplificaren células competentes DH5α de *E.coli* y se multiplicaron en placas con medio LB sólido + ampicilina. Posteriormente, se seleccionaron 8 colonias aisladas de la placa y se analizaron por *Colony* PCR utilizando el primer Fw específico del ADNc de *ELBSP1* y como primer RV el T7 Terminator correspondiente al vector que genera un producto de 729 pb, en caso que la ligación fuera exitosa. Las colonias analizadas se conservaron en una placa Master. También se hicieron controles negativos sin incluir el inserto y controles positivos utilizando ADNc de actina. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel 1,5% de agarosa. Todos los clones analizados contenían un producto de PCR compatible con la construcción buscada.

#### **4.2.2.5. Secuenciación y selección de los clones**

Se seleccionaron 3 colonias para realizar dos cultivos de cada una que se dejaron en agitación ON a 37 °C. Se purificaron los plásmidos mediante un kit comercial (Miniprep, Quiagen®). El resultado se analizó con un gel 1% agarosa. El

ADN plasmídico correspondiente a los clones seleccionados (40  $\mu$ l) fue enviado para su secuenciación para confirmar la identidad del inserto (Macrogen, Corea). Los resultados de las secuencias se analizaron con el programa BioEdit Sequence Alignment. De los 3 clones analizados, utilizamos el único que no contenía ninguna mutación (clon#1).

#### 4.2.2.6. Expresión de la proteína recombinante

Células de *E. coli* Rosetta™ (Novagen) competentes por  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  se transformaron por shock térmico con 2  $\mu$ l (50 ng) del ADN plasmídico proveniente del clon #1. Se utilizó esta cepa bacteriana derivada BL21 para mejorar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente usados en *E. coli*. Esta cepa suministra tRNAs para codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA en un plásmido compatible resistente a cloranfenicol. A partir de una colonia aislada se realizó un cultivo en 5 ml de medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml ampicilina y 20  $\mu$ g/ml cloranfenicol y se incubó a 37 °C en agitación durante 16 horas. Se tomaron 500  $\mu$ l del cultivo y se inocularon en 25 ml de medio LB<sup>Amp/Cn</sup>, y se incubó a 37 °C en agitación hasta una DO=0,4. Luego la incubación continuó a 18 °C hasta alcanzar una DO=0,6. Los cultivos fueron inducidos con 0,1 mM de isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) y como control el cultivo de *Rosetta* sin plásmido se dejó sin inducir y se incubaron ON a 18 °C hasta un OD de 2 aproximadamente.

En todos los casos las células se cosecharon por centrifugación a 1700 xg durante 15 minutos y se resuspendieron en 10 ml de buffer de lisis (PBS a pH 7,4 conteniendo 1 mg/ml lisozima, 2,5 % tritón y 0,5 mM PMSF), posteriormente fueron lisados por sonicación (10 ciclos de 60 Hz de potencia de 10 segundos 30 segundos). El lisado celular fue centrifugado (13000 xg, 30 minutos). Se obtuvo un pellet que fue resuspendido en 10 ml de buffer de lisis. Tanto el pellet como el sobrenadante fueron analizados por SDS-PAGE 12% para verificar la expresión de la proteína cuyo peso molecular esperado es de 42 kDa. La proteína se encontró mayoritariamente en el precipitado celular. En ningún caso se logró obtener parcialmente la proteína en la fracción soluble. La proteína recombinante obtenida fue denominada TrxA-FNx4-His6x, debido a que está compuesta por una tiorredoxina (TrxA), cuatro dominios de fibronectina tipo II (FNx4) y un tag de seis histidinas (His6x) en el extremo C-terminal.

#### 4.2.2.7. Purificación y re-naturalización de la proteína

Con el objetivo de recuperar la proteína de la fracción insoluble el pellet celular se lavó dos veces en buffer de lavado I (20 mM Tris-HCl, pH8, 20000 xg, 30 minutos a 4°) y luego en buffer de lavado II para desnaturalizar y solubilizar las proteínas (50 mM Tris, 50 mM ClNa, 1,5 mM β-mercaptoetanol, 2M urea, 2% tritón, pH8, 20000 xg, 30 minutos a 4°). Posteriormente el pellet obtenido se resuspendió en binding buffer (50 mM Tris, 500 mM ClNa, 10 mM β-mercaptoetanol, 8M urea, 20 mM imidazol), se mantuvo 1 hora en agitación a 4° y luego se centrifugó a 40000 xg y se conservó el sobrenadante.

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo utilizando columnas de afinidad de níquel HiTrap (GE Healthcare®). La columna inicialmente fue lavada con 5 ml de agua bidestilada y cargada con 2 ml de  $\text{So}_4\text{Ni}$  0,1M, se repitió el lavado con 5 ml de agua bidestilada. Luego se equilibró con 5 ml de binding buffer a una velocidad de flujo de 1 ml/min, posteriormente se cargó la proteína en la columna y se descartó el FT y se lavó con 15 volúmenes de binding buffer.

La proteína unida a la columna fue renaturalizada en gradiente lineal decreciente de 14 mM urea/min desde el binding buffer a un buffer sin urea ni dihidrotreitol (50 mM Tris, 500 mM ClNa, 20 mM imidazol,) utilizando un volumen total de 300 mL durante 12 horas. La proteína renaturalizada fue eluida sucesivamente con 4 volúmenes de distintos buffers de elución (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl con 100 mM, 200 mM o 400 mM imidazol), se recolectaron fracciones de 1 ml y se analizaron en SDS-PAGE en un gel 12% acrilamida. La proteína se recuperó en las condiciones de 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol y 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 400 mM imidazol. Las fracciones conteniendo la proteína purificada se polearon y se dializaron contra buffer fosfato, posteriormente se analizaron en gel de poliacrilamida 12%. La concentración de proteína obtenida se midió mediante el método de Bradford (1961).

#### 4.2.3. Marcado de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> con FITC y unión a los espermatozoides

Se incubaron 5 μM del péptido recombinante con 130 mM FITC en DMSO durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación con buffer bicarbonato de sodio, pH 9,5. Posteriormente la solución FITC-proteína se dializó en buffer fosfato 50 mM, 0,15 M NaCl, pH 7,5. La marcación de la proteína se confirmó evaluando el espectro

de absorción de la proteína marcada (entre 280 y 500 nm) y comparándola con el espectro de absorción del FITC puro.

Para evaluar la interacción FITC-TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> con las células espermáticas, 20 millones de espermatozoides congelados/descongelados y lavados a través del uso de Androcol se incubaron con 25 µg de FITC-proteína en PBS. Fueron empleados dos controles: espermatozoides sin FITC sin proteína como control de autofluorescencia y espermatozoides con FITC y sin proteína como control de especificidad. Posteriormente las muestras de espermatozoides fueron fijadas en 4% (v/v) de formaldehído y lavados en 500 µL de PBS (600 xg, 5 min). La unión de la proteína recombinante marcada con FITC se comprobó mediante visualización en microscopio confocal con un objetivo de 60x/1,40 oil  $\infty$ /0,17 DICN2 (Nikon C1siR). Se tomaron imágenes que luego fueron analizadas con el software de distribución libre ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

#### **4.2.4. Evaluación del efecto de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> sobre parámetros de calidad seminal**

##### **4.2.4.1. Estado de capacitación**

Para realizar esta determinación, alícuotas de semen descongelado provenientes de las mismas pajuelas utilizadas en el experimento anterior, con  $5 \times 10^6$  células fueron centrifugadas a 7500 x g durante 5 minutos a 4 °C, luego de descartar el sobrenadante las muestras fueron mezcladas con buffer Laemmli 5x bajo condiciones reductoras (100 mM DTT) y calentadas a 100 °C durante 5 minutos.

Las proteínas solubilizadas fueron separadas por electroforesis en 10% (w/v) de acrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y transferidas a membranas de PVDF (BIO-RAD). Los sitios no específicos fueron bloqueados con una solución bloqueante [TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 8, 120 mM NaCl, 0,05% Tween 20% y 5% de BSA)] durante una hora a temperatura ambiente. Las proteínas fosforiladas fueron detectadas mediante incubación con el anticuerpo primario AntiPKA monoclonal mouse (Santa Cruz<sup>®</sup>) a una dilución de 1:500 en solución bloqueante, durante toda la noche a 4°C, en agitación constante. Luego de varios lavados en TBS-T, las membranas fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con el

anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado con HRP (BioRad,) a una dilución de 1:10000 en solución bloqueante. Posteriormente las membranas fueron reveladas empleando el equipo C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR).

Luego del revelado se procedió a realizar la detección de fosforilación de residuos de tirosina. Para lo cual las membranas se lavaron durante 20 minutos a 60 °C en buffer de stripping (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 6,5), se bloquearon nuevamente con una solución bloqueante (TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 8, 120 mM NaCl, 0,05% Tween 20% y 20% de gelatina) durante una hora a temperatura ambiente. Las proteínas fosforiladas fueron detectadas mediante incubación con el anticuerpo primario AntiPTYR monoclonal mouse (Clone 4G10, Merck) a una dilución de 1:10000 en TBST durante toda la noche a 4°C, en agitación constante. Posteriormente se realizaron los lavados correspondientes e incubación con el anticuerpo secundario y revelado como fue detallado anteriormente. Se repitió el stripping y se realizó el control de carga. Para lo cual se bloquearon nuevamente las membranas y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario mouse monoclonal anti-tubulin (Sigma, T6094) a una dilución de 1:5000. La incubación con el anticuerpo secundario y el revelado fueron realizados de la misma manera descrita anteriormente.

Las imágenes obtenidas luego del revelado de las membranas se analizaron mediante el software Image Studio Lite Versión 5.0. Se cuantificó la intensidad de la señal por unidad de área de cada banda del WB y cada medición se le descontó la intensidad del fondo. Posteriormente la intensidad de cada banda se estandarizó a la intensidad de cada banda de tubulina (control de carga).

#### **4.2.4.2. Movilidad espermática**

Tres pajuelas compuestas por semen congelado obtenido mediante VA realizadas para cumplir con los objetivos del capítulo 1 de esta tesis, fueron descongeladas al azar mediante inmersión en baño de María (37 °C, 20 s), vertidas en 1 mL de Androcoll-E y centrifugadas con el objetivo de remover células muertas y PS (600 x g, 15 min). Se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet celular, en el cual se calculó la concentración espermática. Posteriormente, alícuotas de  $1 \times 10^9$  espermatozoides en 200  $\mu$ l de PBS de volumen final fueron suplementadas con 3, 6  $\mu$ M de FNx4 o 0  $\mu$ M en el grupo control y se incubaron a 37 °C durante dos horas. Los

parámetros de movilidad objetiva fueron evaluados cada 30 minutos. Fueron realizadas cuatro réplicas experimentales.

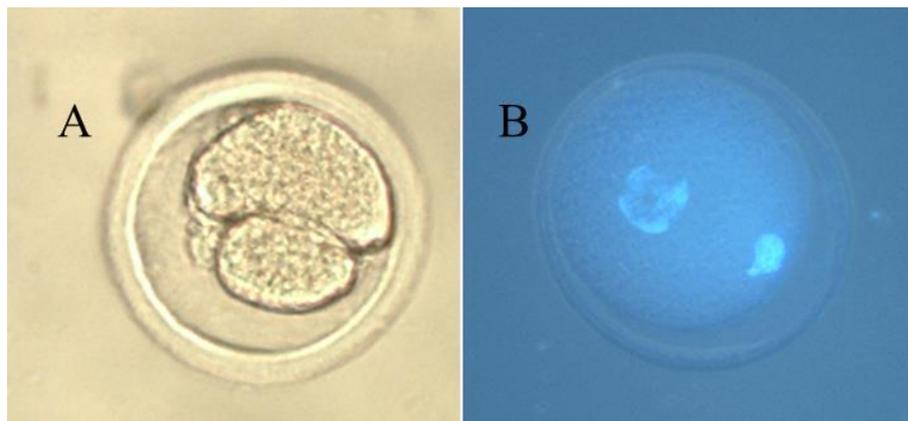
Los parámetros de movilidad fueron estimados mediante el uso de un sistema de análisis computarizado CASA desarrollado por Buchelly y col. (en revisión), para lo cual 7  $\mu$ L de la muestra fueron colocados en una cámara Cell-Vu (20  $\mu$ m; Millennium Sciences), atemperada a 37 °C, y se examinó bajo un microscopio con contraste de fase (Nikon Eclipse E200; 10x). Se grabaron videos a una velocidad de 30 cuadros/s con una cámara (Coolpix S10, Nikon). Se calcularon los mismos parámetros cinéticos que en el capítulo II y fueron analizados a partir de los videos adquiridos con el software desarrollado por Buchelly y col. (comunicación personal).

#### **4.2.4.3. Fecundación *in-Vitro* heteróloga**

Esta técnica se utilizó como un método de evaluación de la calidad espermática ya que permite obtener un valor aproximado de la fertilidad *in vivo* del semen (García-Álvarez *et al.*, 2009).

Los ovocitos bovinos fueron obtenidos de ovarios de matadero y transportados hasta el laboratorio en solución estéril 0,9% de NaCl a 20°C en un período menor a 3 horas. Se realizó la aspiración de los folículos de 2-10 mm haciendo vacío con agujas de 21 mm. Los complejos cúmulus-ovocito (COCs) fueron seleccionados bajo lupa estereoscópica Nikon SM 800 (x30), conservando aquellos que presentaron varias capas compactas de células de cúmulus y estructura homogénea. Posteriormente, los COCs fueron colocados en grupos de 40-60 en placas de maduración conteniendo 400  $\mu$ l de medio TCM-199 suplementado con 50  $\mu$ g/ml de gentamicina, 5,5 mM de lactato de Ca, 2,3 mM de piruvato de Na, 36 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM de HEPES, 0,01UI/ml FSH (Gonal F-75, Serono, UK) y 10% de suero fetal bovino. La maduración se realizó por un período de 24 h en una estufa a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Al completar la maduración, los COCs se lavaron en medio H-SOF y se eliminaron las células del cúmulus mediante un pipeteo suave. Los ovocitos se colocaron en placas de cultivo con medio IVF-SOF suplementado con 10% de suero de oveja en celo y 40  $\mu$ g/ml de gentamicina. Para la fecundación *in Vitro* heteróloga se eligieron al azar 3 pajuelas de semen congelado utilizado en los experimentos del capítulo 1. Las pajuelas fueron descongeladas de la misma manera que fue

mencionada en los demás experimentos y los espermatozoides fueron seleccionados y liberados de los componentes del medio de congelación a través del pasaje por una columna de Precio<sup>®</sup>, según un gradiente discontinuo de densidad (45/90) y se les adicionó 0,15  $\mu\text{M}$ , 0,30  $\mu\text{M}$  de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> o 0  $\mu\text{M}$  en el caso del grupo control. Luego los espermatozoides fueron capacitados en el medio de fertilización durante 10 minutos, después de lo cual fueron co-incubados con los ovocitos bovinos en una concentración final de  $10^6$  espermatozoides /ml a 38,5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. La fecundación heteróloga se evaluó, luego de 40 horas de cultivo, mediante la presencia de división celular y/o de uno o más núcleos en ovocitos fijados y teñidos con Hoechst 33342, en un microscopio de epifluorescencia invertido. Para descartar el efecto partenogénico de la proteína, en cada maniobra se realizó un control de ovocitos suplementados con TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> a los cuales no se incubaron con espermatozoides.



**Figura 18. Fecundación *in vitro* heteróloga positiva.** A: división celular. B: presencia de dos pronúcleos.

#### 4.2.5. Análisis estadístico de los datos

Todos los datos fueron evaluados para la distribución de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza utilizando el procedimiento de modelos lineales generales del paquete estadístico SAS (SAS 2000). Los parámetros se analizaron mediante ANOVA utilizando el procedimiento MIXED del Statistical Analysis System versión 8.2 (SAS Institute INC, Cary, NC). El modelo estadístico incluyó el efecto del agregado de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> en dos concentraciones

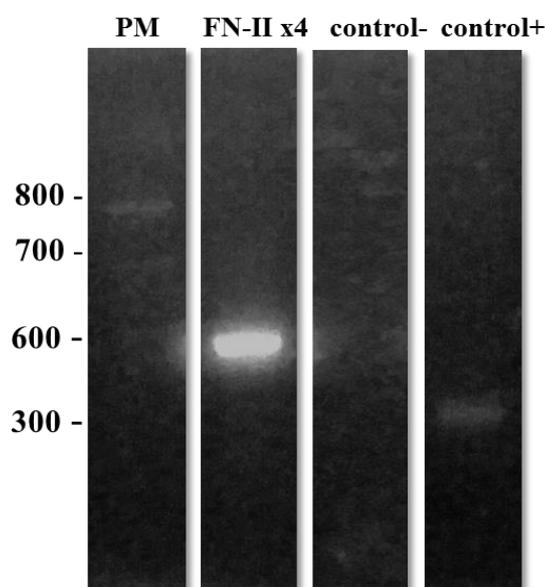
0,15 y 0,30  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresaron como medias mínimas cuadradas (LSM)  $\pm$  error estándar de las medias (SEM). Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron con  $p \leq 0,05$ .

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Producción de la proteína recombinante

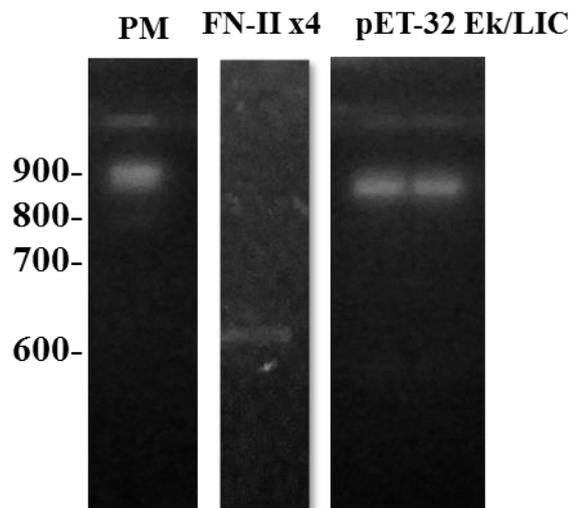
##### 4.3.1.1. Clonado del ADNc de EPIDIDYMAL SPERM BINDING PROTEIN 1 correspondiente a los cuatro dominios FN-II x4 en el vector pET-32 EK/LIC

Mediante el análisis electroforético de los productos de la reacción de PCR utilizando como templado una biblioteca de ADNc de epidídimo bovino se comprobó la presencia del ADNc correspondiente a la región proteína EPIDIDYMAL SPERM BINDING PROTEIN 1 (ELSPBP1) compuesta por 4 dominios de FN-II (FN-II x4). Se utilizaron primers diseñados específicamente para el fragmento comprendido por los cuatro dominios (FN-II x4) y se obtuvo el producto de 600 pb (figura 18).

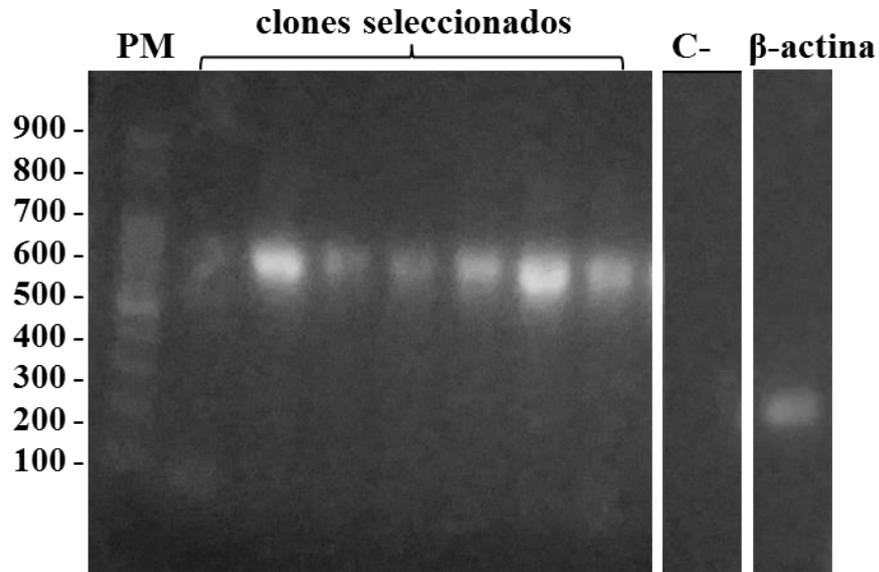


**Figura 19. Análisis electroforético de los productos de la reacción de PCR realizada sobre la biblioteca de ADNc de epidídimo bovino.** Los productos se sembraron en un gel de 1% agarosa y se visualizaron con Syber Safe. PM: Marcadores de peso molecular. FN-II x4: amplificación utilizando primers específicos para ADNc correspondiente a los cuatro domios de FN-II de la proteína Epididymal Sperm Binding Protein 1 (ELSPBP1). control -: sin ADNc (control negativo). control +: amplificación utilizando primers específicos para ADNc de  $\beta$ -actina (315 pb) y utilizando como templada biblioteca de epidídimo bovino (control positivo).

Luego de digerir el ADNc correspondiente al vector pET-32 Ek/LIC y el ADNc correspondiente al fragmento FN-II x4 (figura 19), se realizó la reacción de ligación para insertar el ADNc de interés entre los sitios KpnI y XhoI del vector y los productos de la ligación se transformaron en células competentes DH5 $\alpha$  de *E.coli* y se plaquearon. Siete de las ocho colonias seleccionadas y analizadas por Colony PCR contenían un producto de PCR de 645 pb compatible con un tamaño compatible con la construcción buscada (figura 20). Se seleccionaron 3 clones positivos y se confirmó la identidad de uno de ellos por secuenciación. Se descartaron los otros dos por poseer mutaciones puntuales.



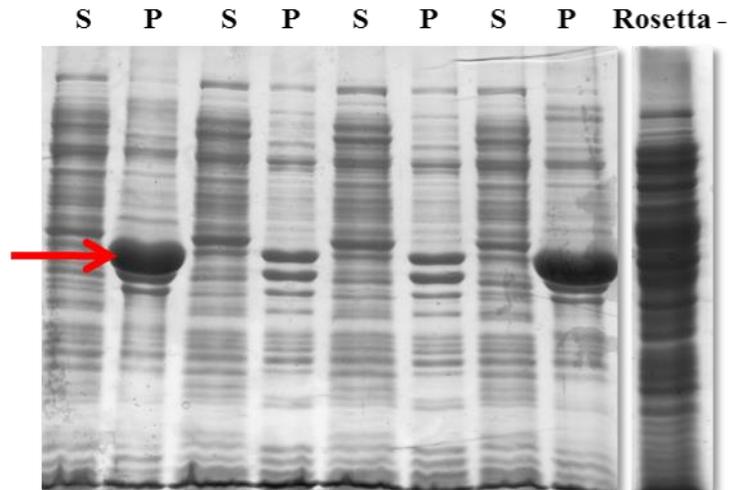
**Figura 20. Análisis electroforético de los productos de digestión del inserto y del vector.** Los productos se sembraron en un gel de 1,5% agarosa y se visualizaron con Syber Safe. PM: Marcadores de peso molecular. FN-II x4: ADNc digerido correspondiente al fragmento compuesto por 4 dominios de FN-II de la proteína Epididymal Sperm Binding Protein 1 (ELSPBP1). pET-32 Ek/LIC: primera y segunda elución de los productos de la digestión del vector pET-32 Ek/LIC.



**Figura 21. Análisis electroforético de los productos de la reacción de Colony PCR.** Los productos de PCR se sembraron en gel de 1,5% agarosa y se visualizaron con Syber Safe. PM: Marcadores de peso molecular. Clones analizados. C-: control negativo. β-actina: ADNc actina con primers específicos actina (control positivo).

#### 4.3.1.2. Expresión de la proteína recombinante TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> en *E. coli*

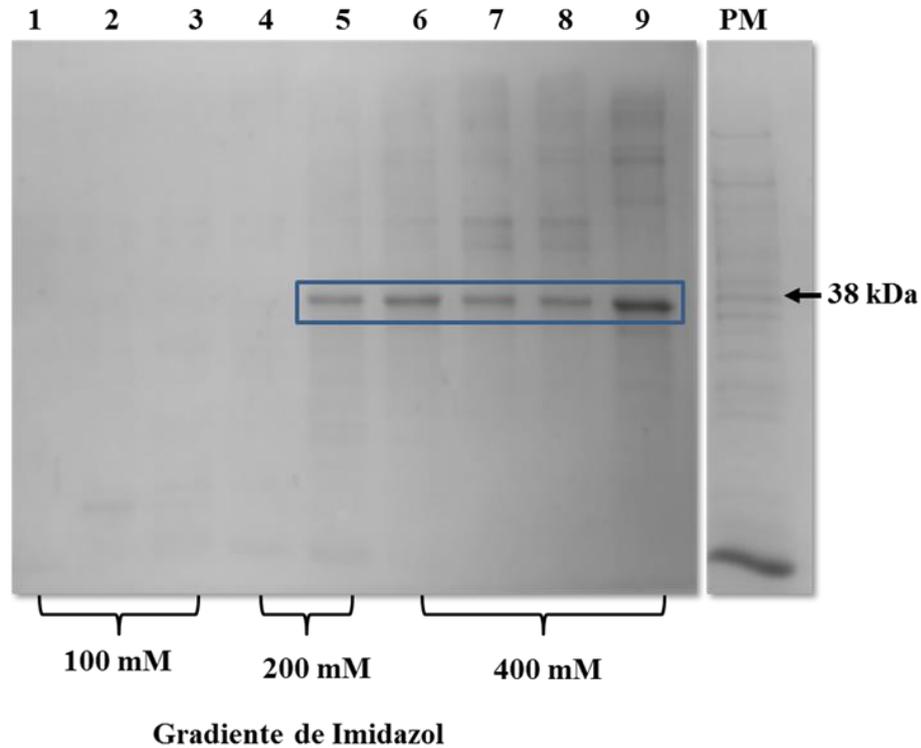
Con el objetivo de expresar la proteína recombinante TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> células de *E. coli Rosetta*<sup>™</sup> competentes se transformaron con ADN plasmídico proveniente del clon #1. La proteína recombinante tuvo un alto grado de expresión y fue detectada, luego de la lisis celular, mayoritariamente en la fracción precipitada o pellet celular (figura 21).



**Figura 22. Sobreexpresión de la proteína recombinante TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub>.** Análisis electroforético para verificar expresión de proteína recombinante en el precipitado celular. Se muestran los resultados de las diferentes pruebas para solubilizar la proteína. S: fracciones solubles; P: fracciones precipitadas; Rosetta-: bacterias de la cepa Rosetta sin inducir. La flecha indica la proteína buscada en las fracciones precipitadas de todas las construcciones.

#### 4.3.1.3. Purificación y re-naturalización de la proteína

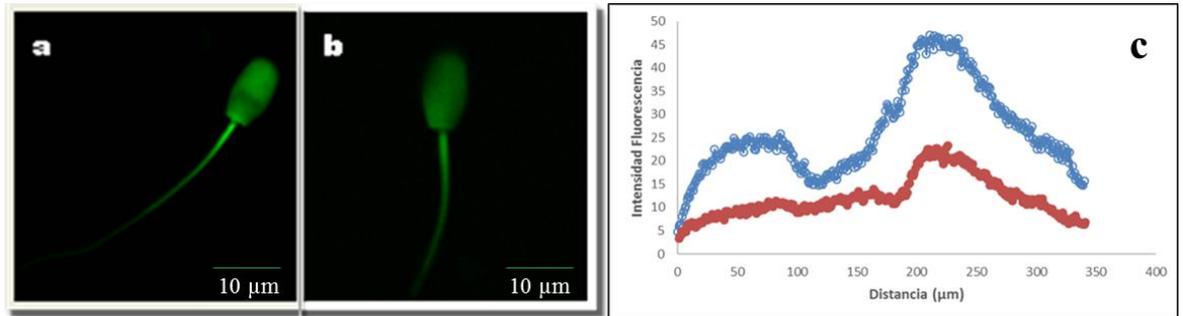
Luego de la solubilización de la fracción precipitada o cuerpos de inclusión, la proteína recombinante TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> fue recuperada por cromatografía de afinidad al níquel. El análisis por electroforesis reveló la presencia de la proteína en las fracciones eluidas de la columna utilizando 200 y 400 mM imidazol (figura 22)



**Figura 23. Purificación de la proteína recombinante TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub>.** Análisis electroforético de las fracciones eluidas de la columna de afinidad para verificar la presencia del péptido recombinante. Las calles 1 a 9 muestran las diferentes fracciones eluidas utilizando un buffer de elución con 100, 200 y 400 mM de imidazol. PM: marcadores de peso molecular. El recuadro muestra el péptido TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> detectado en las fracciones 5 a 9.

#### 4.3.2. Marcado de la proteína con FITC y unión a los espermatozoides

Para validar el correcto plegado de la proteína TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> renaturalizada se evaluó su capacidad de unión a espermatozoides a través de la marcación con el colorante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma). Observamos una diferencia en el grado y distribución de la fluorescencia con mayor intensidad en los espermatozoides incubados con TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> marcada con FITC, observándose la marca mayoritariamente en la región acrosomal y pieza media, de acuerdo a lo reportado para la proteína nativa ELSBP1 o para otras proteínas con dominios de FN-II (Plante *et al.*, 2014).



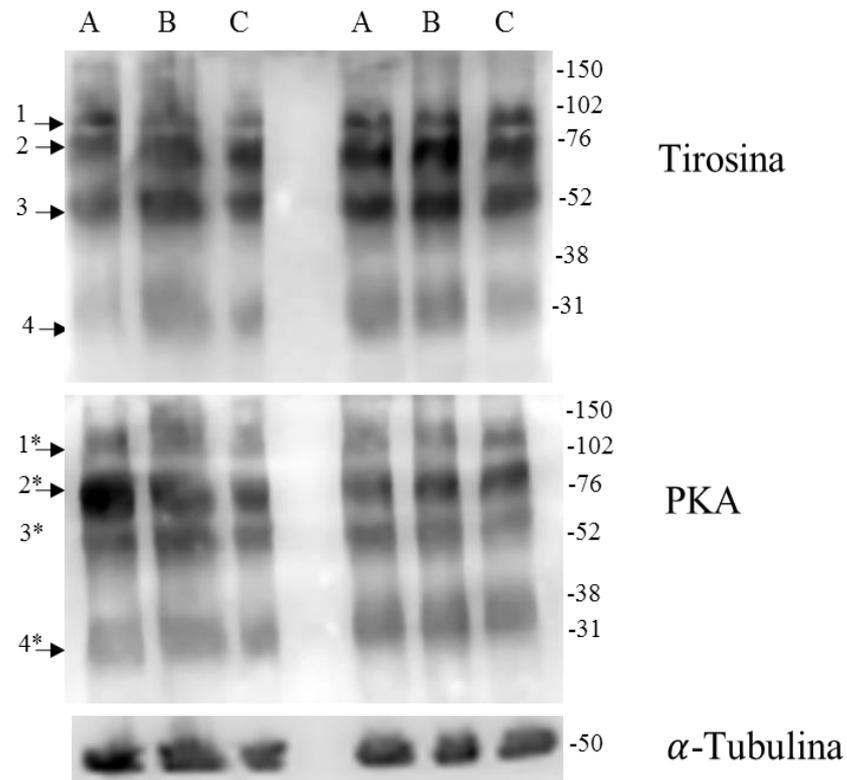
**Figura 24. Microscopía confocal de fluorescencia de la proteína TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> purificada y refoldada conjugada con FITC en espermatozoides congelados/descongelados.** (a) Espermatozoide incubado con TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub>+FITC. (b) Espermatozoide incubado con FITC (control). (c) Gráfico de distribución de fluorescencia. La distancia (μm) fue medida a lo largo de un eje trazado desde la región apical hasta el último punto de fluorescencia visible del flagelo. La línea azul corresponde al espermatozoide (a) y la línea roja al espermatozoide (b).

#### 4.3.3. Efecto de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> sobre la calidad seminal

##### 4.3.3.1. Estado de capacitación

Con el objetivo de evaluar un posible efecto de la proteína recombinante sobre la reversión o minimización de los signos moleculares de criocapacitación, se estudió el estado de fosforilación de los residuos de tirosina y de sustratos fosforilados por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Estas determinaciones se realizaron por medio de western blot a partir de un extracto total de proteínas de espermatozoides tratados post-descongelación con 0,15 o 0,30 μM de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub>, luego de 120 minutos de incubación. Se detectó un patrón con cuatro bandas definidas y cuantificables en cada tratamiento, tanto para la fosforilación en tirosina como para los sustratos fosforilados por PKA (figura 24). El análisis de la densitometría de cada banda indicó que no existieron diferencias estadísticas en las intensidades de ninguna de las bandas fosforiladas en tirosina entre los tratamientos con TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> a la descongelación y el control. Contrariamente, se encontraron diferencias significativas en las intensidades de todas las bandas detectadas para los sustratos fosforilados por PKA ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos y el control. Las dos concentraciones de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> evaluadas 0,15 y 0,30 μM ocasionaron una reducción de la señal de fosforilación, determinada a partir de la reducción de la intensidad de las cuatro

bandas observadas de aproximadamente 102, 76, 52 y 31 kDa. No fueron detectadas diferencias estadísticas entre las dos concentraciones de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> evaluadas.



**Figura 25. Evaluación del patrón de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y sustratos de PKA en espermatozoides criopreservados.** La fosforilación fue detectada mediante western blott empleando un anticuerpo anti-fosfotirosina (panel superior) y anti-PKA (panel inferior), a partir de proteínas totales obtenidas luego de un período de incubación de 120 min de espermatozoides tratados con 0,15  $\mu$ M (A) o 0,30  $\mu$ M (B) de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub>. Se realizó la cuantificación de la intensidad de la señal detectada para cada banda relativizada a la intensidad detectada con anti-tubulina. \*Diferencias significativas con respecto a cada banda control (C) (\*  $p < 0,05$ ).

**Tabla 7.** Cuantificación densitométrica de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y sustratos de PKA en espermatozoides criopreservados luego de su incubación con 0,15  $\mu$ M o 0,30  $\mu$ M de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> (media  $\pm$  SEM).

Proteína	0,15 $\mu$ M	0,30 $\mu$ M	Control
102 kDa Tyr	0,013 $\pm$ 0,001	0,013 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,001
76 kDa Tyr	0,015 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,001	0,018 $\pm$ 0,001
52 kDa Tyr	0,17 $\pm$ 0,001	0,017 $\pm$ 0,001	0,021 $\pm$ 0,001
31 kDa Tyr	0,015 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,001	0,018 $\pm$ 0,001
102 kDa PKA	0,173 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,176 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,209 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>
76 kDa PKA	0,227 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,240 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,279 $\pm$ 0,010 <sup>b</sup>
52 kDa PKA	0,236 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,241 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,287 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup>
31 kDa PKA	0,162 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,159 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,200 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>

Se muestran valores medios  $\pm$ SEM. Letras diferentes (abc) entre columnas dentro de la misma línea indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3.2. Movilidad espermática

Dado que la movilidad espermática es el parámetro más frecuentemente utilizado para medir indirectamente la viabilidad celular, se evaluaron distintos parámetros cinéticos mediante CASA a lo largo de 120 minutos de incubación (37°C), en espermatozoides descongelados y tratados con la proteína recombinante. Los resultados encontrados se contrastaron con los de los espermatozoides no tratados (control).

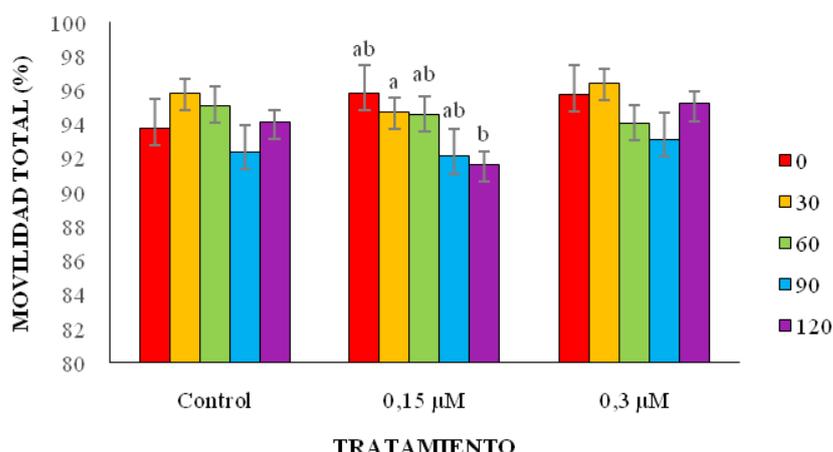
Al evaluar la movilidad total (MT) se detectó una interacción significativa entre el agregado de 0,15  $\mu$ M de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> y el tiempo de incubación ( $p= 0,05$ ), con una movilidad espermática mayor a los 30 minutos en comparación con 120 minutos de incubación en este tratamiento. No detectamos diferencias entre los tratamientos y el grupo control para esta variable ( $p=0,61$ ) (figura 25).

En cuanto a la movilidad espermática progresiva no observamos interacción entre los tratamientos y el tiempo de incubación ( $p=0,703$ ). Tampoco encontramos diferencias entre los tratamientos y el grupo control ( $p=0,52$ ), con una movilidad espermática progresiva promedio de  $27,68 \pm 2,57$  %. Observamos diferencias significativas entre los tiempos de incubación ( $p=0,0005$ ). Como es esperado, observamos disminución de este parámetro a lo largo del tiempo de incubación con

valores de  $34,86 \pm 2,91$  % al inicio y  $19,02 \pm 2,91$  % de movilidad espermática progresiva a los 120 min de incubación.

En relación al estudio de los parámetros relacionados con la velocidad espermática velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL) y velocidad media (VAP) se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) únicamente entre los diferentes tiempos de incubación, con los menores valores a los 120 minutos. Para VSL con valores de  $299,02 \pm 27,98$   $\mu\text{m}/\text{seg}$  y  $144,90 \pm 27,98$   $\mu\text{m}/\text{seg}$ ; para VCL  $467,41 \pm 39,46$   $\mu\text{m}/\text{seg}$  y  $246,98 \pm 39,46$   $\mu\text{m}/\text{seg}$  y para VAP  $399,07 \pm 33,59$   $\mu\text{m}/\text{seg}$  y  $207,66 \pm 33,59$   $\mu\text{m}/\text{seg}$  al inicio y al final del período de incubación, respectivamente.

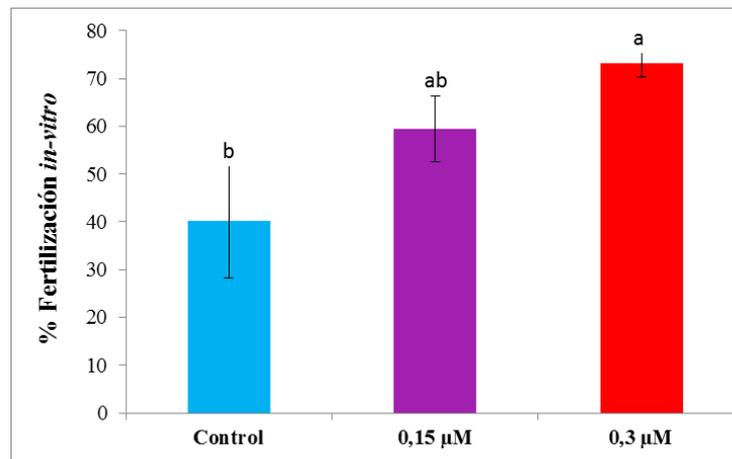
Al evaluar las variables frecuencia de batido (BCF; HZ), rectitud del movimiento (STR) y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH;  $\mu\text{m}$ ) observamos que todas se comportaron de la misma manera, mostraron diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación en estudio ( $p = 0,002$ ,  $p = 0,004$  y  $p = 0,007$ , respectivamente). Con una disminución hacia los 120 minutos de incubación. Para BCF se registraron valores de  $3,61 \pm 0,29$  y  $2 \pm 0,29$  Hz; para STR  $11,92 \pm 0,87$  y  $8,79 \pm 0,87$  % y para ALH  $3,03 \pm 0,18$  y  $2,12 \pm 0,18$   $\mu\text{m}$  al inicio y al final del período de incubación, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de estas variables ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 26. Movilidad total de espermatozoides congelados/descongelados incubados durante 0, 30, 60, 90 y 120 minutos con 0 (control), 0,15  $\mu\text{M}$  o 0,3  $\mu\text{M}$  de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub>.** Se representan valores medios  $\pm$  SEM de la movilidad expresada en porcentaje (%). Letras distintas (a, b, c) indican diferencias significativas entre tiempos de incubación dentro del tratamiento ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.3.3. Capacidad fecundante

Con el objetivo de evaluar si el agregado de la proteína recombinante a los espermatozoides afectaba su capacidad de penetrar un ovocito y fecundarlo se realizó la prueba de fertilización *in vitro* heteróloga, ya que ha sido demostrado que tiene una elevada correlación con la fertilidad evaluada a campo (García-Álvarez *et al.*, 2009). Observamos que el agregado de 0,3  $\mu\text{M}$  de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> ocasionó una mayor tasa de fecundación que el control ( $p= 0,0236$ ). La tasa de fecundación se midió través del conteo de células divididas y/o de la presencia de dos pronúcleos. No detectamos diferencias entre el control y el agregado de 0, 15  $\mu\text{M}$  de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> (figura 30).



**Figura 27. Efecto del agregado de TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub> a espermatozoides congelados/descongelados sobre el porcentaje de fecundación *in-vitro* heteróloga, evaluado a través del conteo de células divididas y/o de la presencia de dos pronúcleos. Se representan valores medios  $\pm$  SEM.**

#### 4.4. DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo fue el clonado y expresión *in vitro* de una proteína compuesta por cuatro dominios de fibronectina tipo II y la evaluación de su efecto luego del agregado a espermatozoides congelados/descongelados sobre su capacitación, movilidad y potencial fecundante. Logramos clonar y expresar con éxito un péptido conteniendo cuatro dominios de fibronectina tipo II fusionados a una tiorredoxina y un tag de seis histidinas terminales, por lo que la denominamos TrxA-FNIIx4-His<sub>6x</sub>. Esta proteína fue producida en *E. coli* y luego de su desnaturalización y re-naturalización fue capaz de unirse a los espermatozoides congelados/descongelados, de revertir los signos moleculares de capacitación y de aumentar el porcentaje de fecundación.

La criopreservación representa un gran estrés para la membrana plasmática del espermatozoide, lo que resulta en un rearrreglo y desestabilización de sus componentes y entrada de Ca<sup>++</sup> a la célula (de Leeuw *et al.*, 1993; Noiles *et al.*, 1995; Maxwell; Johnson, 1999; Collin *et al.*, 2000). White (1993) hipotetizó que el aumento de permeabilidad se debe a cambios estructurales irreversibles en la arquitectura de la membrana, causados por el enfriamiento por debajo de la temperatura de transición de los fosfolípidos que la componen. Por debajo de la temperatura de transición, ocurre un cambio abrupto de fase de gel a cristal-líquido de los fosfolípidos que conducirían a cambios estructurales subletales e irreversibles en la membrana que conllevan a un incremento de su permeabilidad. Dado que las membranas espermáticas se componen de fosfolípidos específicos según la especie (White, 1993) y que cada fosfolípido tiene una temperatura de transición de fase precisa, el grado de daño estructural depende de la temperatura y la composición lipídica de cada membrana. La membrana plasmática del espermatozoide ovino tiene características que le confieren una elevada sensibilidad al estrés térmico en comparación con los de otras especies. Estas características son los niveles muy elevados de fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados y muy bajos de colesterol. Darin-Bennett y White (1975) establecieron una relación molar alta de colesterol: fosfolípidos en espermatozoides humanos y de conejos en comparación con la relación molar del ovino y bovino (1:0 y 0:4, respectivamente), esta relación elevada origina una membrana más compacta, menos permeable y por lo tanto más resistente al estrés térmico en el caso de las dos primeras especies.

A medida que el semen es sometido a un protocolo de criopreservación, se forman cristales de hielo en el medio extracelular, aumentando la osmolaridad de la fracción de agua no congelada. El agua intracelular se difunde fuera de los espermatozoides en respuesta a este gradiente osmótico, deshidratando la célula. Al descongelarse, el fenómeno se repite, pero en sentido inverso, a medida que los cristales de hielo extracelulares se derriten y el agua se difunde. La deformación ultraestructural de la membrana plasmática ocurre como consecuencia del estrés osmótico y el cambio drástico en el volumen durante la congelación y descongelación. El aumento de permeabilidad de la membrana permite un mayor ingreso a la célula de iones como  $\text{Ca}^{++}$  y bicarbonato (Kadirvel *et al.*, 2009; Albrizio *et al.*, 2015) que, sumado a la deshidratación celular y la pérdida de ácidos grasos poliinsaturados y colesterol, desencadenan la criocapacitación por medio de la vía de señalización de PKA, con la subsecuente fosforilación de proteínas, especialmente en los residuos de tirosina. La criocapacitación reduce la vida media del espermatozoide criopreservado (Bailey *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2006) y su capacidad de unirse a las células de la zona pelúcida del ovocito, lo que vuelve al espermatozoide, aunque viable, incapaz de fecundar (Watson, 1995).

Desde hace varios años se continúa evaluando la posibilidad de incluir aditivos, tanto en los medios de congelación como de descongelación espermática, para prevenir o revertir los efectos indeseables de la criopreservación. Es así, que se ha reportado que el agregado de PS a los espermatozoides previo a su congelación o luego de su descongelación revirtió la fosforilación de proteínas en varias especies como porcinos (Vadnais; Althouse, 2011), ovinos (Pérez-Pé *et al.*, 2001) y equinos (de Andrade *et al.*, 2012). Sin embargo, esta capacidad del PS depende de la concentración de sus componentes, por lo que es difícil predecir su efecto. Además, el uso de PS como aditivo plantea un riesgo sanitario por la posible propagación de enfermedades de transmisión sexual al utilizar fluidos animales.

La función crioprotectora y reversora del daño ocasionado por la congelación ha sido atribuida a un grupo de proteínas del PS que tienen la capacidad de interactuar con componentes de la membrana espermática, especialmente a las denominadas RSVP14 y RSVP20. Estas proteínas que se originan en las vesículas seminales e interactúan con los espermatozoides luego de la eyaculación, pertenecen a la familia de las proteínas compuestas por un doble dominio de fibronectina tipo II, que media la interacción con el espermatozoide a través de los fosfolípidos del tipo

colina presentes en la superficie espermática. Este dominio, además, proporciona sitios de unión con macromoléculas como colágeno, fibrina, actina, heparina y ADN. Por lo tanto, hipotetizamos que la capacidad de revertir los daños que tienen las proteínas plasmáticas estaría dada por la presencia de estos dominios. Como ya fue mencionado, el efecto protector del PS es muy variable y depende de la presencia y concentración de estas proteínas. Por lo que su producción *in vitro* y agregado como aditivos al medio de descongelación representaría una herramienta biotecnológica útil para preservar la calidad y capacidad fecundante de los espermatozoides congelados. Si bien, Serrano *et al.* (2013) realizaron la clonación y expresión tanto de RSVP14 como de RSVP20 (Serrano *et al.*, 2015), no se ha realizado hasta la actualidad ningún estudio en el que se haya suplementado los medios de congelación y/o descongelación con estas proteínas definidas, ni se conoce su mecanismo de acción.

Nuestro primer desafío fue obtener la proteína TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub>, ya que las proteínas compuestas por dominios FN II suelen acumularse en cuerpos de inclusión y al querer extraerlas tienden a perder su actividad. Pese al agregado del dominio TrxA, el péptido recombinante se expresó de manera insoluble en todas las condiciones ensayadas. Para resolver esta problemática agregamos una etapa de desnaturalización y posterior purificación y replegamiento en columna. El uso de 6 M de urea para desnaturalizar los agregados de proteínas seguido de un gradiente decreciente de 6 a 0 M de urea en la columna fue adecuado para reducir el número de agregados presentes. Posteriormente, corroboramos el correcto plegado de la proteína confirmando su capacidad de unión. Observamos que se unió a los espermatozoides, especialmente en la zona de la cabeza y pieza media, como fue reportado para otras proteínas con dominios de FN-II en bovinos (Manjunath *et al.*, 1999), ratones y humanos (Plante *et al.*, 2012).

El siguiente desafío fue definir la concentración de proteína a evaluar. Acorde a lo reportado por Barrios *et al.* (2005) para RSVP14 evaluamos el agregado de 13  $\mu\text{M}$  de TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub>. Al observar que los espermatozoides tratados perdían su movilidad totalmente luego de 30 minutos de incubación a 37 °C disminuimos la concentración a la mitad (6,5  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, continuamos observando los mismos resultados negativos en cuanto a la movilidad. Posteriormente, decidimos utilizar en nuestros ensayos 0,15  $\mu\text{M}$  y 0,30  $\mu\text{M}$ , basándonos en los trabajos de Serrano *et al.* (2013).

La pieza media de los espermatozoides es la región que contiene las mitocondrias, y a menudo se asocia con la movilidad espermática, por lo cual luego de observar la unión específica de la proteína a esta región, esperábamos que su agregado a los espermatozoides mejorara este parámetro. Sin embargo, la evaluación objetiva de las variables de movilidad por video microscopía, demostró que no existió diferencia entre el grupo control y los espermatozoides suplementados con TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub> en ninguna de las concentraciones evaluadas, aunque se detectó una interacción entre el tiempo de incubación y el agregado de 0,15  $\mu$ M TrxA-FN-IIx4 His<sub>6x</sub> para la variable movilidad total. En cuanto a las medidas de velocidad (lineal, circular y media), estas no se vieron influenciadas por la suplementación con proteína recombinante y disminuyeron conforme aumentó el tiempo de incubación, hipotetizamos que esto fue debido a una cuestión meramente biológica de agotamiento de reservas energéticas. Lo mismo ocurrió con las variables que miden la frecuencia de golpe cruzado (BCF), la rectitud del movimiento (STR) y el desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH).

Los resultados de la cuantificación de la señal emitida por la fosforilación de proteínas como signo molecular de capacitación, indicarían que el agregado de TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub> revierte la criocapacitación, mejorando el estado funcional de los espermatozoides en este aspecto. Por este motivo, la suplementación de proteínas decapacitantes al medio de descongelación demuestra ser una estrategia factible para atenuar algunas proteínas que se fosforilan en respuesta a la criocapacitación. Si bien en este trabajo no detectamos diferencias significativas en cuanto a la reducción de la fosforilación de tirosina de las proteínas, si fue observada la reducción significativa de la señal emitida por la fosforilación de sustratos de PKA luego del agregado de TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub>. La proteína quinasa A (PKA) es parte de una familia de enzimas cuya actividad depende de la concentración de AMPc y cuya actividad es responsable de la fosforilación de proteínas en residuos Ser y Thr. La relevancia de la actividad de la PKA en la capacitación ha sido demostrada indirectamente ya que su inhibición produce el bloqueo de la movilidad espermática y de otras señales downstream como la fosforilación de proteínas en residuos Tyr. En ratones, la eliminación de genes relacionados con la actividad de PKA, resulta en un fenotipo macho-estéril. Este fenotipo presenta anomalías relacionadas con la capacitación como defectos en la regulación de la fosforilación en tirosina de las proteínas espermáticas como deficiencias en el inicio de la movilidad hiperactivada. Esto demuestra que la activación de PKA por cAMP es un evento previo a la activación de la tirosina quinasa

Src (Revisado en Visconti *et al.*, 2011). El hecho de haber detectado en nuestro estudio actividad sobre la PKA y no sobre la tirosina nos hace pensar que tal vez el tiempo de incubación con FN-IIx4His<sub>6x</sub> fue insuficiente para revertir la fosforilación en tirosina, o bien que tal vez la fosforilación de tirosina fue desencadenada por otra vía diferente a PKA, como por ejemplo concentraciones de ROS, desencadenados por la criopreservación (Jin; Yang, 2017).

Los resultados promisorios encontrados en este estudio referente al efecto decapacitante que tendría TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub> al ser suplementada al medio de descongelación estuvieron acompañados por mejoras en el porcentaje de fecundación. Durante años se ha intentado correlacionar alguna prueba de calidad espermática con la fertilidad medida a campo, y se ha encontrado que la mejor evaluación es la fecundación *in vitro* (Byrne *et al.*, 2000; O' Meara *et al.*, 2005), ya que evalúa la capacidad del espermatozoide de unirse y penetrar un ovocito. Los laboratorios que no tienen la posibilidad de realizar esta determinación, debido a sus costos y a la necesidad de equipamiento especializado, normalmente realizan una batería de pruebas espermáticas que determinan la funcionalidad del espermatozoide. En trabajos realizados por García-Álvarez *et al.* (2009) y Valente *et al.* (2010) demostraron que la prueba de fertilidad *in vitro* heteróloga, utilizando ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta, es una prueba eficaz para predecir la fertilidad de carneros. Por esta razón utilizamos esta prueba para, a través de la cuantificación de células divididas y/o dos pronúcleos, determinar el efecto del agregado de 0,15  $\mu\text{M}$  o 0,30  $\mu\text{M}$  de TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub> en el medio de fecundación sobre el potencial fecundante de los espermatozoides congelados/descongelados. A través de nuestros resultados podemos decir que el agregado de 0,3  $\mu\text{M}$  de TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub> a los espermatozoides mejoró las tasas de fecundación con respecto al control. Varios investigadores han demostrado que el agregado de PS a espermatozoides criopreservados mejoró las tasas de fecundación, tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes especies como ovinos y cerdos (Maxwell *et al.*, 1999; Rozeboom *et al.*, 2000), esto podría deberse a las proteínas plasmáticas, que como fue mencionado anteriormente, se componen de dominios de FN-II que les aportan capacidad de unión a las células del ovocito. Por lo tanto, es esperable que el agregado a los espermatozoides de 0,3  $\mu\text{M}$  TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub> ocasione mejoras en el potencial fecundante, ya que es una proteína compuesta por 4 de los dominios FNII, esto podría potenciar la capacidad de unión y penetración al ovocito. Si bien, aún se requieren resultados de la aplicación de TrxA-FN-IIx4His<sub>6x</sub> sobre la fecundación *in vivo*, podríamos estar frente a una herramienta

biotecnológica que mejora las tasas de fecundación del espermatozoide criopreservado a través del aumento de su capacidad de unión al ovocito y de la disminución de capacitación.

## Conclusiones generales

- ✓ Los eyaculados frescos obtenidos con electroeyaculador tienen una mejor calidad seminal que los obtenidos con vagina artificial y son más resistentes a los daños ocasionados por la criopreservación. En base a estas observaciones no rechazamos la primera hipótesis planteada en esta tesis: "Los espermatozoides obtenidos mediante electroestimulación presentan mayor resistencia a los daños ocasionados por la criopreservación".
  
- ✓ De las cinco proteínas que identificamos en el plasma seminal: RSVP14, RSVP22, BINDER OF SPERM 5 PRECURSOR, CLUSTERIN y EPIDIDYMAL SECRETORY PROTEIN E1 PRECURSOR, las tres primeras estuvieron aumentadas en el plasma seminal obtenido mediante electroeyaculación. Son proteínas que pertenecen a la familia de las BSP (BINDER OF SPERM PROTEINS) y que se caracterizan por tener un doble dominio de fibronectina tipo II. Se sabe que este dominio estabiliza las membranas espermáticas. Estos resultados confirman la segunda hipótesis planteada en este trabajo: "La mayor resistencia de los espermatozoides obtenidos con electroeyaculador a los daños causados por la criopreservación estaría dada por la elevada concentración relativa de proteínas de bajo peso molecular presentes en el plasma seminal"
  
- ✓ El agregado posdescongelación de PPSiE revierte los signos moleculares de criocapacitación en los espermatozoides. Sin embargo, no modificaron los parámetros fisiológicos y cinéticos al considerar a la muestra como una población homogénea.
  
- ✓ El método y la estación de colecta de las PPSiE no ejercen ningún efecto sobre su actividad.
  
- ✓ El semen congelado/descongelado es una población heterogénea constituida por subpoblaciones espermáticas.
  
- ✓ Los espermatozoides congelados/descongelados de carneros con alta y baja fertilidad presentan diferencias en la distribución de sus subpoblaciones espermáticas.

- ✓ Las PPSiE modifican la distribución de las subpoblaciones espermáticas en muestras seminales congeladas/descongeladas.
  
- ✓ Logramos expresar un péptido compuesto por cuatro dominios de FN-II, una tiorredoxina y un tag de histidina en *E. coli* (TrxA-FNIIx4His6x).
  
- ✓ TrxA-FNIIx4His6x se acumula en cuerpos de inclusión insolubles, pero puede ser recuperada mediante una estrategia de solubilización y refoldado.
  
- ✓ La proteína recombinante TrxA-FNIIx4His6x se une a la zona apical de la cabeza y a la pieza intermedia de los espermatozoides.
  
- ✓ TrxA-FNIIx4His6x disminuye la señal de criocapacitación medida a través de la disminución de la fosforilación en sustratos de PKA, y aumenta el porcentaje de fecundación *in vitro* heteróloga utilizada en una concentración de 0,3  $\mu$ M.
  
- ✓ En base a todo lo expuesto anteriormente podemos aceptar la tercera hipótesis de esta tesis: “El agregado de proteínas de bajo peso molecular en el medio de congelación/descongelación mejora la calidad y capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides ovinos congelados/descongelados”.

## IMPLICANCIAS PARA INVESTIGACIONES FUTURAS

Aunque esta tesis presentó aportes originales al entendimiento de la fisiología espermática y al comportamiento de los espermatozoides frente a distintos procesos biotecnológicos como la criopreservación, algunos aspectos no han sido totalmente dilucidados y surgen nuevos interrogantes a resolver en investigaciones futuras.

Algo a resaltar que se desprende de esta tesis, es la necesidad de trabajar sobre subpoblaciones espermáticas, ya que un eyaculado aún luego de ser sometido al proceso de congelación/descongelación sigue manteniendo cierto grado de heterogeneidad. El sistema de análisis CASA resulta ser una herramienta útil para establecer cambios en las subpoblaciones como consecuencia de determinados tratamientos o procesos.

Por otro lado, la proteína recombinante ha sido evaluada en el medio de descongelación espermática previa eliminación de PS y de diluyentes de congelación mediante el uso de coloides. Resulta de interés entonces, estudiar su efecto sin este lavado, para poder diseñar estrategias para el envasado de la proteína junto a los espermatozoides. Esto permitiría que, al momento de descongelar en el mismo envase, puedan contactarse la proteína y los espermatozoides.

Pese a que evaluamos el efecto del agregado de TrxA-FNIIx4-His6x a los espermatozoides sobre su capacidad de fecundar *in vitro*, aún resta evaluar esta capacidad sobre la fertilidad *in vivo* por las vías de inseminación cervical y laparoscópica.

En el desarrollo de esta tesis no fue posible evaluar la aplicación del péptido recombinante a los espermatozoides previo a su congelación y la evaluación de su efecto sobre la calidad espermática. Para completar este proyecto y acercarnos a la elaboración de un método que disminuya los efectos perjudiciales de la criopreservación y sea adoptado por el sector productivo es fundamental evaluar la inclusión del péptido en los medios de congelación y su efecto sobre la funcionalidad espermática.

Se espera incurrir en estos interrogantes en investigaciones futuras.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ABAIGAR, T.; HOLT, W.; HARRISON, R.; DEL BARRIO, G. 1999. Sperm subpopulations in boar and gazelle semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod.* 60, 32-41.
- ABAIGAR, T.; CANO, M.; PICKARD, A.; HOLT, W. 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction.* 122, 265-273.
- ABDELHAKEM, A.; GRAHAM, E.; VAZQUEZ, I. 1991. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology.* 28, 36-42.
- AITKEN, R.; KOPPERS, A. 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian JAndrol.* 13, 36-42.
- ALBRIZIO, M.; MORAMARCO, A.; NICASSIO, M.; MICERA, E.; ZARRILLI, A.; LACANDRA, G. 2015. Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. *Theriogenology.* 83, 421-429.
- ALGHAMDI, A.; FOSTER, D.; TROEDSSON, M. 2004. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction.* 127, 593-600.
- ALVAREZ, J.; STOREY, B. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.* 13, 232-241.
- AMANN, R. Cryopreservation of sperm. 1999. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (eds.) *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press. New York, United States. pp. 773-783.
- ANEL-LÓPEZ, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; SOLER, A.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; GARDE, J.; MORRELL, J. 2015. Use of Androcoll-S after thawing improves the quality of electroejaculated and epididymal sperm samples from red deer. *Anim Reprod Sci.* 158, 68-74.
- ARNOULT, C.; CARDULLO, R.; LEMOS, J.; FLORMAN, H. 1996. Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Nat Acad Sci.* 93, 13004-13009.
- ASADPOUR, R. 2012. Relationship between mineral composition of seminal plasma and semen quality in various ram breeds. *Acta Scientiae Veterinariae.* 40, 1-8.

- ASHWORTH, P.; HARRISON, R.; MILLER, N.; PLUMMER, J.; WATSON, P. 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fert Dev.* 6,173-180.
- AUSTIN, C.; HUPP, E.; MURPHREE, R. 1961. Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *J Dai Sci.* 44,292-297.
- BAILEY J.; BILODEAU, J. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 21, 1-7.
- BAILEY J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. 2003. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci.* 3,393-401.
- BALDI, E. 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci.* 1, 189-205.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATOO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.* 63,1531-1537.
- BARRIOS, B.; FERNANDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl.* 26, 539-549.
- BARTLES, J. 1995. The spermatid plasma membrane comes of age. *Trends Cell Biol.* 5, 400-404.
- BASU, A.; LI, X.; LEONG, S. 2011. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92, 241-251.
- BENOFF, S. 1993. Preliminaries to fertilization: the role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. *Hum Res.* 8, 2001.
- BENOFF, S. 1997. Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod.* 3, 599-637.
- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 71, 461-470.
- BERKMEN, M. 2012. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 82, 240-251.
- BERLEC, A.; STRUKELJ, B. 2013. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40, 257-274.
- BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; FORNES, M.; ALBERIO, R.; CESARI, A. 2011. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology.* 76,436-447.

- BESSETTE, P.; ASLUND, F.; BECKWITH, J.; GEORGIU, G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 13703-13708.
- BILODEAU, J.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.; GAGNON, C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*. 55, 282-288.
- BLACKSHAW, A. 1953. The motility of ram and bull spermatozoa in dilute suspension. *J Cell Biol*. 36, 449-462.
- BLASCHUK, O.; BURDZY, K.; FRITZ, I. 1983. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem*. 258, 7714-7720.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- BRADY, D.; GILDOW, E. 1939. Characteristics of ram semen as influenced by the method of collection. *J Anim Sci*. 1, 250-254.
- BRANDON, C.; HEUSNER, G.; CAUDLE, A.; FAYRER-HOSKEN, R. 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*. 52, 863-873
- BRAVO, J.; MONTANERO, J.; CALERO, R.; ROY, T. 2011. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Anim Reprod Sci*. 129, 22-29.
- BUFFONE, M.; FOSTER, J.; GERTON, G. 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int J Dev Biol*. 52, 511-522.
- BUFFONE, M.; WERTHEIMER, E.; VISCONTI, P.; KRAPP, D. 2014. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim Biophys Acta*. 1842, 2610-2620.
- BURGESS, R. 2009. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol*. 463, 259-282.
- BUTTS, A.; LITVAK, M.; TRIPPEL, E. 2010. Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Theriogenology*. 73, 873-885.
- BYRNE, G.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.; BOLAND, M. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci*. 62, 265-275.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.; CENTURION, F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. 2004. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod Dom Anim*. 39, 370-375.

- CABALLERO, I.; PARRILLA, I.; ALMIÑANA, C.; DEL OLMO, D.; ROCA, J.; MARTINEZ, E., VAZQUEZ, J. 2012. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reprod Dom Anim.* 47, 12-21.
- CALVETE, J.; SANZ, L. 2006. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Soc ReprodFertil Supp.* 65, 201-215.
- CARDOZO, J.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T. 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology.* 66, 841-850.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; MORONI, M.; MINELLI, A. 2000. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 63, 275-282.
- CATT, S.; O'BRIEN, J.; MAXWELL, W.; EVANS, G. 1997. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell sorting by flow cytometry. *Reprod Dom Anim.* 32,251-258.
- CENTURION, F., VAZQUEZ, J.; CALVETE, J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E. 2003. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol Reprod.* 69, 640-646.
- CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D.; MAJUMDER. 2007. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology.* 64, 27-35.
- CHOW, P.; PANG, S.; WONG, T. 1986. Fertility, fecundity, sex ratio and the accessory sex glands in male golden hamsters. *J Androl.* 9,312-32.
- COLAS, G. 1983. Factors affecting the quality of ram semen. *Proceedings-Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham* pp. 453-465.
- COLAS, G.; BRICE, G. 1976. Seasonal variations of the fertilizing capacity of deep-frozen ram semen. In *Proceedings of the Eighth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*.vol. 4, Crakow, Poland, pp. 977-980.
- COLAS, C.; JUNQUERA, C.; PEREZ-PE, R.; CEBRIAN-PEREZ, J.; MUIÑO-BLANCO, T. 2009. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microsc Res Tech.* 72, 566-572
- COLLIN, S.; SIRARD, M.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J Androl.* 21, 938-943.
- CORMIER, N.; SIRARD, M.; BAILEY, J. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl.* 18, 461-468.
- COURTENS, J.; EKWALL, H.; PAQUIGNON, M.; PLOËN, L. 1989. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *J Reprod Fert* 87, 613–626.

- CROSS, N. 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the mayor inhibitor. *Biol Reprod.* 54,138-145.
- CROSS, N. 2003. Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol Reprod.* 69, 529-534.
- CROSS, N. 2004. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod.* 71, 1367-1373.
- CURRY, M. 2007. Cryopreservation of mammalian semen. *Methods Mol Biol.* 368, 303-311.
- CURRY, M.; MILLAR, J.; TAMULI, S.; WATSON, P. 1996. Surface area and volume measurements for ram and human spermatozoa. *Biol Reprod.* 55, 1325-1332.
- CURRY, M.; WATSON, P. 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology.* 31, 39-46.
- DAM, A; FEENSTRA, I.; WESTPHAL, J.; RAMOS, L.; GOLDE, R.; KREMER, J. 2007. Globozoospermia revisited. *Hum Reprod.* 13, 63–75.
- DAMAI, R.; ANBAZHAGAN, V.; RAO, K; SWAMY, M.2009. Fluorescence studies on the interaction of choline-binding domain B of the major bovine seminal plasma protein, PDC-109 with phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1794, 1725-1733.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. 1975. Cholesterol and phospholipid content of mammalian spermatozoa and its relation to membrane structure and cold-shock. *J Reprod Fertil.* 2, 383-384.
- DAVID, I.; KOHNKE, P.; LAGRIFFOUL, G.; PRAUD, O.; PLOUARBOUÉ, F.; DEGOND, P.; DRUART, X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Anim Reprod Sci.* 161, 75-81.
- DE ANDRADE, A.; ZAFFALON, F.; CELEGHINI, E.; NASCIMENTO, J.; BRESSAN, F. F., MARTINS, S.; DEARRUDA, R. 2012. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology.* 77, 1866-1872.
- DE LAMIRANDE, E.; CAGNON, C. 1984. Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract. *J Androl.* 5, 269-276.
- DE LAMIRANDE, E.; TSAI, C.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. 1998. Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl.* 19, 585-594.
- DE LEEUW, F.; CHEN, H.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology.* 27,171-183
- DE LEEUW, F.; DE LEEUW, A.; DEN DAAS, J.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing

- compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30, 32-44.
- DEMAIN, A.; VAISHNAV, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 27, 297-306.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. 1992: Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem.* 267, 10149-10155.
- DESNOYERS, L.; THEARIEN I.; MANJUNATH P. 1994. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Rep Dev* 37, 425–435.
- DEVIREDDY, R.; SWANLUNDS, D.; ALGHAMDI, A.; DUOOS, L.; TROEDSSON, M.; BISCHOFF, J.; ROBERTS, K. 2002. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. *Reproduction*.124, 643-648.
- DOMÍNGUEZ, M.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*. 69,564-573.
- DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.; NAVARRETE SIERRA, L.; CRUZ TAMAYO, A.; AGUIAR LORIO, A.; EROSA DENEIS, S.; BOLIO OSES, R.; GONZALEZ PARRA, E.; PAREDES MONSREAL, L.; RAMÓN UGALDE, J. 2007. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Revista Científica FCV-LUZ* 17, 73-76
- DONNELLY, E.; LEWIS, S.; MC NALLY, J.; THOMPSON, W. 1998. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fert Steril.* 70, 305-314.
- DONOVAN, 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen–thawed semen at a natural or synchronized oestrus. *Anim Reprod Sci.* 84, 359-368.
- DOTT, H.; HARRISON, R.; FOSTER, G. 1979: The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil.*55, 113-124.
- DZIUK, P.; GRAHAM, E.; PETERSEN, W. 1954. The technique of electroejaculation and its use in dairy bulls. *J Dai Sci.* 37, 1035-1041.
- EDIDIN, M. 1997. Lipid microdomains in cell surface membranes. *Curr Opin Struct Biol.* 7, 528-532.
- EDDY, E.; O' BRIEN, D. 2006. The spermatozoon. In: Plant, T.M ; Zelenik, A.J. (eds.) *Knobil and Neill's physiology of reproduction vol 1 Academic Press : Amsterdam* pp. 3-54.
- ELLERMAN, D.; PEI, J.; GUPTA, S.; SNELL, W.; MYLES, D.; PRIMAKOFF, P. 2009. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Mol Reprod Dev.* 76, 1188-1199.

- EVANS, J. 2012. Sperm-egg interaction. *Annu Rev Physiol.* 74, 477-502.
- FAHY, G. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology.* 23, 1-13.
- FAN, J.; LEFEBVRE, J.; MANJUNATH, P. 2006. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: a new expanding superfamily in mammals. *Gene.* 375, 63-74.
- FERNÁNDEZ-GAGO, R.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ALONSO, M.; GONZALEZ, J.; ALEGRE, B.; DOMÍNGUEZ, J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. 2016. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma improves motility, modifies subpopulation patterns and reduces chromatin alterations. *Reprod Fertil Dev.* 29(8) 1576-1584 <http://dx.doi.org/10.1071/RD15530>.
- FERRER-MIRALLES, N.; DOMINGO-ESPIN, J.; CORCHERO, J.; VAZQUEZ, E.; VILLAVERDE, A. 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact.* 8, 17-25.
- FLESCH, F.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L.; GADELLA, B. 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 262, 787-792.
- FLESCH, F.; GADELLA, B. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys.* 1469, 197-235.
- FOOTE, R. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci.* 80, 1-10.
- FOURNIER-DELPECH, S.; THIBAUT, C. 1993. Acquisition of sperm fertilizing ability. In: Thibault C., Levasseur MC, Hunter RHF, (eds.) *Reproduction in mammals and man.* Ellipses: Paris, France pp. 257–278.
- FRASER, L. 1995. Ionic control of sperm function. *Reprod Fertil Dev.* 7, 905-925.
- GADELLA, B. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci.* 107:229.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTINEZ-PASTOR, F.; FERNANDEZ-SANTOS, M.; ESTESO, M.; PEREZ-GUZMAN, M.; SOLER, A. 2009. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology.* 71, 643-650.
- GARCÍA ARTIGA, C. 1994. Test de endósmosis en ovino. In: 7th International Meeting on Animal Reproduction. 6-9 July, Murcia, pp 77-81.
- GARNER, D.; THOMAS, C.; GRAVANCE, C.; MARSHALL, C.; DE JARNETTE, J.; ALLEN, C. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology.* 56, 31-40.
- GIBBS, G.; O'BRYAN, M. 2006. Cysteine rich secretory proteins in reproduction and venom. *Society of Reproduction and Fertility supplement.* 65, 261-267.

- GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 59, 1157-1170.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W. 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fert.* 54, 271-283.
- GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. 2008. Seminal plasma proteins regulate the association of lipids and proteins within detergent-resistant membrane domains of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 78, 921-931.
- GOPAL, G.; KUMAR, A. 2013. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* 32, 419-425.
- GRAHAM, J. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology.* 41, 1151-1162.
- GREEN, C.; WATSON, P. 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction.* 122, 889-898.
- GROSSMANN, M.; SANTALÓ, J. 1991. Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol.* 42, 87-108.
- GURAYA, S. 2000. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Int Rev Cytol.* 199, 1-64.
- HAGIWARA, M.; CHOI, J.; DEVIREDDY, R.; ROBERTS, K.; WOLKERS, W.; MAKHLOUF, A.; BISCHOF, J. 2009. Cellular biophysics during freezing of rat and mouse sperm predicts post-thaw motility. *Biol Reprod.* 81, 700-706.
- HAMMERSTEDT, R.; GRAHAM, J.; NOLAN, J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive?. *J Androl.* 11:73-88.
- HARRISON, R. 1996. Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev.* 8, 581-594.
- HARRISON, R.; GADELLA, B. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology.* 63, 342-351.
- HAYNES, N.; SCHANBACHER, B. 1983. Control of reproductive activity in the ram. *Proceedings-Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham* pp 431-451.
- HEDRICH, J.; LOTTAZ, D.; MEYER, K.; YIALLOUROS, I.; JAHNEN-DECHENT, W.; STOCKER, W.; BECKER-PAULY, C. 2010. Fetuin-A and Cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases. *Biochemistry.* 49, 8599-8607.
- HENAULT, M.; KILLIAN, G.; KAVANAUGH, J.; GRIEL Jr, L. 1995. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol Reprod.* 52, 390-397.
- HENRICKS, D.; KOUBA, A.; LACKEY, B.; BOONE, W.; GRAY, S. 1998. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biol Reprod.* 59, 330-337.

- HOLT, W.; NORTH, R. 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J Exp Zool.* 230,473-483.
- HOLT, C.; HOLT, W.; MOORE, H.1996. Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *J Androl.* 17, 587-596.
- HOLT, W.; MOORE, H.; HILLIER, S. 1985. Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays. *FertilSteril.* 44, 112-119.
- HOLT, W.; MEDRANO, A. 1997. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. *J Reprod Fert.* 52, 213-222.
- HOLT, W.; VAN LOOK, K. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction.* 127, 527-535.
- HOWES, E.; HURST, S.; LASLOP, A.; JONES, R. 1998. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *MolHum Reprod.* 4, 673-681.
- HULET, C.; FOOTE, W.; BLACKWELL, R. 1964. Effects of natural and electrical ejaculation on predicting fertility in the ram. *J. Anim. Sci.* 23,418-424.
- HUNTER, T. 2000. The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect.* 94, 81-120.
- IKAWA, M.; WADA, I.; KOMINAMI, K.; WATANABE, D.; TOSHIMORI, K.; NISHIMUNE, Y.; OKABE, M. 1997. The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility. *Nature.* 387, 607-611.
- INOUE, N.; IKAWA, M.; ISOTANI, A.; OKABE, M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 434, 234-238.
- JALKANEN, J.; HUHTANIEMI, I.; POUTANEN, M. 2005. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biol Reprod.* 72, 1268-1274.
- JEYENDRAN, R.; VANDERVEN, H.; PÉREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.; ZANEVELD, L. 1984: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 70, 219-228.
- JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; DEL OLMO, E.; PÉREZ-GUZMAN, M.; BISBAL, A.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; GARDEL, J.; SOLER, A. 2012.Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Anim Reprod Sci.* 132, 88-95.
- JIN, M.; FUJIWARA, E.; KAKIUCHI, Y.; OKABE, M.; SATOUH, Y.; BABA, S.; CHIBA, K.; HIROHASI, N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their

acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12), 4892-4896.

- JOBIM, M.; OBERST, E.; SALBEGO, C.; WALD, V.; HORN, A.; MATTOS, R. 2005. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*. 63, 2053–2062.
- JONAKOVA, V.; MANASKOVA, P.; TICHA, M. 2007. Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *J Chromatography*. 849, 307–314.
- JONES, R.; MANN, T. 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogeneous phospholipids. *J Reprod Fertil*. 50, 261-268.
- JOHNSON, J.; OMLAND, K. 2004. Modelselection in ecology and evolution. *Trends in Ecology &Evolution*. 19, 101-108.
- JUYENA, N.; STELLETTA, C. 2012. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Androl*. 33, 536-5.
- KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A.; KATHIRAVAN, P. 2009. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Anim ReprodSci*. 116, 244-253.
- KIM, K.; CHA, M.; GERTON, G. 2001. Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol Reprod*. 64, 36-43.
- KLINOVSKA, K.; SEBKOVA, N.; DVORAKOVA-HORTOVA, K. 2014. Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *Int J Mol Sci*. 15, 10652–10668.
- KOPPERS, A.; REDDY, T.; O'BRYAN, M. 2011. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. *Asian JAndrol*. 13, 111-117.
- KROGENAES, A.; ANDERSEN BERG, K.; HAFNE, A.; ENGELAND, E. 1994. Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Vet Scand*. 35, 17-26.
- KUMAR, R.; ATREJA, S. 2012. Effect of Incorporation of Additives in tris-based egg yolk extender on Buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm tyrosine phosphorylation during cryopreservation. *Reprod Dom Anim*. 47, 485–490
- KUMARESAN, A.; SIQUEIRA, A.; HOSSAIN, M.; JOHANNISSON, A.; ERIKSON, I.; WALLGREN, M.; BERQVIST, A. 2012. Quantification of kinetic changes in protein tyrosine phosphorylation and cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in boar spermatozoa during cryopreservatioin. *Reprod Fertl Dev*. 24, 531-542.
- LAEMMLI, U.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERG, G. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*. 47, 69 – 85.

- LARSSON, K.; EINARSSON, S. 1976. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand.* 17, 74-82.
- LA VALLIE, E.; DI BLASIO, E.; KOVACIC, S.; GRANT, K.; SCHENDEL, P.; MCCOY, J. 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm *Bio/Technology.* 11, 187-193.
- LEAHY, T.; MARTI, J.; EVANS, G.; MAXWELL, W. 2010. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 119, 147-153.
- LEDESMA, A. 2012. Efecto del método de colecta de semen y de plasma seminal sobre la supervivencia posdescongelación de espermatozoides ovinos. Tesis Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 120p.
- LIGHTFOOT, R.; SALAMON, S. 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. *J Reprod Fertil.* 22, 385-398.
- LIN Y-N, R.; A.; YAN, W.; BURNS, K.; MATZUK, M. 2007. Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 27, 6794-6805.
- LITTELL, R.; PENDERGAST, J.; NATARAJAN, R. 2000. Tutorial in biostatistics: modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Statistics in Medicine,* 19, 1793-1819.
- LOOMIS, P. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 22, 663-676.
- LÓPEZ-RODRÍGUEZ, A.; RIJSSELAERE, T.; BEEK, J.; VYT, P.; VAN SOOM, A.; MAES, D. 2013. Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine.* 59, 5-12.
- LOVE, C.; BRINSKO, S.; RIGBY, S.; THOMPSON, J.; BLANCHARD, T.; VARNER, D. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology.* 63, 1584-1591.
- LUNA, C.; YESTE, M.; DEL ALAMO, M.; DOMINGO, J.; CASAO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J.; MUIÑO-BLANCO, T. 2017. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reprod Fertil Dev.* 29, 394-405.
- MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; CEROLINI, S.; PENNY, P.; NOBLE, R. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology.* 63, 411-421.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod.* 67, 1250-1258.
- MANJUNATH, P.; THERIEN, I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.* 53, 109-119.

- MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P.; FAN, J.; WRIGHT, M. 2009. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod.* 80, 394-397.
- MANJUNATH, P. 1984 Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: Sairam, M.; Atkinson, L. (eds.) *Gonadal proteins and peptides and their biological significance*. World Scientific Publ. Co., Singapore, pp.49-61.
- MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. 2007. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 217-228.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; GADEA, J.; VICENTE, J.; VIUDESDECASTREO, M. 2005. Effect of semen collection method on pre and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64, 1756-1765.
- MARTINEZ, P.; MORROS, A. 1996. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci.* 1, 103-17.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCÍA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; HERRAEZ, P.; ANEL, L.; DE PAZ, P. 2005. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod.* 72, 316-327.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; TIZADO, E.; GARDE, J.; ANEL, L.; DE PAZ, P. 2011. Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology.* 75, 783-795.
- MATA-CAMPUZANO, M.; ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; DEL OLMO, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; GARDE, J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. 2012. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 C in presence of several antioxidants. *Theriogenology.* 78, 1005-1019.
- MATTNER, P.; VOGLMAYR, J. 1962. A comparison of ram semen collection method by the artificial vagina and by electroejaculation. *Aust J Exp Agric Anim Husband.* 2, 78-81.
- MAXWELL, W. 1986. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim Reprod Sci.* 10, 301-308.
- MAXWELL, W.; WATSON, P. 1996. Recent Progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 42, 55-65
- MAXWELL, W.; WELCH, G.; JOHNSON, L. 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Rep Fert Dev.* 8, 1165-1178.
- MAXWELL, W.; LONG, C.; JOHNSON, L.; DOBRINSKY, J.; WELCH, G. 1998. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fert Dev.* 10, 433-440.

- MAXWELL, W.; JOHNSON, L. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52, 1353-1362.
- MAXWELL, E.; EVANS, G.; MORTIMER, S.; GILLAN, L.; GELLATLY, E.; MC PHIE, C. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fert Dev.* 11, 123 – 126
- MAXWELL, W.; DE GRAAF, S.; GHAOUI, R.; EVANS, G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 64(1):13-38
- MAZUR, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 247, 125-142.
- MAZUR, P.; MILLER, R. 1976. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose. *Cryobiology.* 13, 523-536.
- MELO, R.; SPENCER, L.; DVORAK, A.; WELLER, P. 2008. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J Leukocyte Biol.* 83, 229-236.
- MENDOZA, N.; CASAO, A.; DEL VALLE, I.; SERRANO, E.; NICOLAU, S., ASUMPCAO, M. PEREZ-PE, R. 2012. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromatography B.* 880, 74-81.
- MOORE, A.; SQUIRES, E.; GRAHAM, J. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation equine spermatozoa. *Theriogenology.* 63, 2372-2381.
- MORTIMER, D. 1994: Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fert Dev.* 6, 25-31.
- MORTIMER, S.; MAXWELL, W. 2004. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction.* 127, 285-291.
- MORTIMER, S.; MAXWELL, W. 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Rep Fert Dev.* 11, 25-30.
- MORRELL, J.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. 2009. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology.* 72, 879-884.
- MORRIER, A.; CASTONGUAY, F.; BAILEY, J. 2003. Conservation of fresh ram spermatozoa at 5 °C in the presence of seminal plasma. *Can J Anim Sci.* 83, 221-227.
- MOROZOV, V. 1959. Elaboration of the problems of preservation of semen of farm animals in a frozen state. *Zhivotnovodstvo.* 21, 66-72.

- MOURA, A.; CHAPMAN, D.; KOC, H.; KILLIAN, G. 2006. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J Androl.* 27,534-541.
- MOURA, A.; SOUZA, C.; STANLEY, B.; CHAPMAN, D.; KILLIAN, G. 2010. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J Proteom*, 73, 2006-2020.
- MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Dom Anim.* 43, 18-31.
- MULDREW, K.; MCGANN, L. 1990. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J.* 57, 525-532.
- NEIL, J.; OLDS-CLARKE, P. 1987. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res.* 18, 121 –140
- NOILES, E.; BAILEY, J.; STOREY, B. 1995. The temperature dependence in the hydraulic conductivity,  $L_p$ , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0 C. *Cryobiology.* 32, 220-238.
- O' FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrología.* 29, 269-275.
- O' MEARA, C.; HANRAHAN, J.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; RIZOS, D.; WADE, M.; LONERGAN, P. 2005. Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology.* 64, 1797-1808.
- O' MEARA, C.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.; DUFFY, P.; FAIR, S.; EVANS, A.; LONERGAN, P. 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology.* 67, 1262-1268.
- OKABE, M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development.* 140, 4471-4479.
- OLDEN, K.; BERNANRD, B.; HUMPHRIES, M.; YEO, T.; YEO, K.; WHITE, S.; PARENT, J. 1985. Function of glycoprotein glycans. *Trends Biochem Sci.* 10, 78-82.
- OLDENHOF, H.; FRIEDEL, K.; SIEME, H. 2010. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology.* 61, 115-122.
- OLLERO, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; LÓPEZ-PÉREZ, M.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. 1996. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J Androl* 19, 287-292.
- OLLERO, M.; GARCIA-LOPEZ, N.; PEREZ-PE, R.; CEBRIAN-PREZ, J.; MUIÑO-BLANCO, T. 1997. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase. *Reprod Fertil Dev.* 9, 381–390.

- OURA, C.; TOSHIMORI, K. 1990. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int Rev Cytol.* 31, 105-51.
- PANG, S.; CHOW, P.; WONG, T. 1979. The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J Reprod Fert.* 56, 129-132.
- PANKHURST, G.; BENNETT, C.; EASTERBROOK-SMITH, S. 1998. Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin. *Biochemistry.* 37, 4823-4830.
- PARKS, J.; GRAHAM, J. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 38, 209-222.
- PAWSON, T. 2004. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell.* 116, 191-203.
- PEGG, D. 2007. Principles of cryopreservation. In: Day, J.G.; Stacey, G.N. (eds.) *Cryopreservation and freeze-drying protocols* pp 39-57. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2\_3
- PEÑA, F.; SARARVIA, F.; NUÑEZ-MARTINEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, H. 2006. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?. *Anim Reprod Sci.* 93, 101-113.
- PEREZ, L.; VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology.* 46, 131-40.
- PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.; MUIÑO-BLANCO, T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology.* 56, 425-434.
- PÉREZ-PÉ, R.; GRASA, P.; FERNANDEZ-JUAN, M.; PELEATO, M.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.; MUIÑO-BLANCO, T. 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 61, 226-233.
- PINEDA, M.; DOOLEY, M.; HEMBROUGH, F.; HSU, W. 1987. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am JVetRes.* 48, 562-568.
- PINEDA, M.; DOOLEY, M. 1991. Effect of method of seminal collection on the retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res* 52, 307-313.
- PINHEIRO, J.; BATES, D. 2000. *Mixed-effects models in S and SPLUS*. Springer: New York, USA pp 3-52
- PLANTE, G.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. 2012. Characterization of recombinant murine binder of sperm protein homolog 1 and its role in capacitation. *Biol Reprod.* 87, 1-11.
- PLANTE, G.; THÉRIEN, I.; LACHANCE, C.; LECLERC, P.; FAN, J.; MANJUNATH, P. 2014. Implication of the human Binder of SPERM Homolog 1 (BSPH1) protein in capacitation. *Mol Hum Reprod.* 20, 409-421.

- PURSEL, V.; JOHNSON, L. 1975. Freezing of boars spermatozoa alter fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci.* 40, 99-102.
- QUINN, P.; White, I. 1966. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J ReprodFertil.* 12, 263-270.
- QUINN, P.; SALAMON, S.; WHITE, I. 1968. The effect of cold shock and deep-freezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina. *Australian Journal of Agricultural Research.*19, 119-128.
- QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology.* 59, 1973-1990.
- QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology.* 61, 673-690.
- RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, A.; SOUSA, A.; RODRIGUES, A.; MARTINS, L; BAPTISTA, M.; MOTA, P.; TAVARES, R.; AMARAL, S.; GAMBOA, S. 2007. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. In: Mendez-Vilas, A.; Diaz, J. (eds.) *Modern research and educational topics in microscopy.* 1, 394-402.
- RATTO, M.; HUANCA, W.; SINGH, J.; ADAMS, G. 2005. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reprod Biol Endocrin.* 3, 29.
- REDDY, N.; MOHANARAO, G.; ATREJA, S. 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci.* 119, 183-190.
- REGO, J.; MOURA, A.; NOUWENS, A.; MC GOWAN, M.; BOE-HANSEN, G.2015. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. *Anim Reprod Sci.* 160, 126-137.
- RICKARD, J.; PINI, T.; SOLEILHAVOUP, C.; COGNIE, J.; BATHGATE, R.; LYNCH, G.; EVANS, G.; MAXWELL, W.; DRUART, X.; DE GRAAF, S. 2014. Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa. *Reproduction.* 148,469-478.
- ROBERTS, K.; WAMSTAD, J. 2003. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod* 69(2): 572-581.
- ROZEBOOM, K.; TROEDSSON, M.; HODSON, H.; SHURSON, G.; CRABO, B.2000. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *J Anim Sci.* 78, 443-448.

- SAID, T.; GAGLANI, A.; AGARWAL, A. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod BioMed* 21, 456–462. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310003263> - aff2
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci.* 37, 185-249.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 62, 77-111.
- SANCHEZ-LUENGO, S.; AUMÜLLER, G.; ALBRECHT, M.; SEN, P.; ROHM, K.; WILHELM, B. 2004. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Androl.* 25, 234-244.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrin.* 2, 12.
- SANTIAGO-MORENO, J.; COLOMA, M.; DORADO, J.; PULIDO-PASTOR, A.; GOMEZ-GUILLAMON, F.; SALAS-VEGA, R.; GOMEZ-BRUNET, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. 2009. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology.* 71, 1253-1260.
- SANTIANI, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: Efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis Magíster en Ciencias mención Biología de la Reproducción. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile. 200p.
- SATORRE, M.; BREININGER, E.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. 2007.  $\alpha$ -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology.* 68, 958-965.
- SCHOENECK, 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, 633-642.
- SERRANO, E.; MARTÍNEZ, A.; ARRUGA, D.; PÉREZ-PE, R.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PE, J. 2015. New insights into the phylogeny and gene context analysis of binder of sperm proteins (BSPs). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137008>.
- SERRANO, E.; PEREZ-PE, R. 2013. Characterization of the cDNA and in vitro expression of the ram seminal plasma protein RSVP14. *Gene.* 519, 271-278.
- SINGER, S.; NICOLSON, G. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175, 720-731.
- SIMPSON, A.; SWAN, M.; WHITE, I. 1986. Action of phosphatidylcholine in protecting ram sperm from cold-shock. *Gamete Res.* 15, 43, 56.

- SINGH, S.; ATREJA, S.; KUMAR, R.; CHHILLAR, S.; SINGH, A. 2012. Assessment of intracellular  $Ca^{2+}$ , AMPc and 1,2 diacylglycerol in cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa on supplementation of taurine and trehalose in the extender. *Reprod Dom Anim.* 47, 584-590.
- SINGH, S.; PANDA, A. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng.* 99, 303-310.
- SINGH, V.; UPADHYAY. 2015. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *Methods Mol Biol.* 1258, 283-291
- SHADAN, S.; JAMES, P.; HOWES, E.; JONES, R. 2004. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod.* 71, 253-265.
- SMITH, J.; PARR, J.; MURRAY, G.; MC DONALD, R.; LEE, R. 1999. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. *Proc New Zealand Society of Animal Production.* 59, 223-225.
- SOUZA, C.; REGO, J.; LOBO, C.; OLIVEIRA, J.; NOGUEIRA, F.; DOMONT, G.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F.; MORENO, F.; MONTEIRO-MOREIRA, FIGUEIREDO, J.; MOURA, A. 2012. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Proteomics.* 75, 4436–4456.
- STEWART E.; ASLUND, F.; BECKWITH, J. 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *Embo J.* 17, 5543- 5550.
- SUAREZ, S. 1996. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl.* 17:331–335.
- SUZUKI, K.; ASANO, A.; ERIKSSON, B.; NIWA, K.; NAGAI, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2002. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int JAndrol.* 25, 84-93.
- SYMONDS; M.; MOUSSALLI, A. 2011. A brief guide to model selection, multimodel inference and model averaging in behavioural ecology using Akaike's information criterion. *Behav Ecol Sociobiol.* 65, 13–21.
- THERIEN, I.; BERGERON, A.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. 2005. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Rep Dev.* 71, 97–106.
- TERRILL, C. 1940. Comparison of ram semen collection obtained by three different methods for artificial insemination. *J Anim Sci.* 1940(1)201-207
- THOMAS, A.; MEYERS, S.; BALL, B. 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology.* 65, 1531-1550.

- THUNDATHIL, J. GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B. 1999. Premature capacitation post-thaw and the fertility of AI bull semen. *Theriogenology*. 18, 90-98.
- TROEDSSON, M.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.; DAHMS, B.; DOW, C.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.; MACPHERSON, M.; POZOR, M.; BUHI, W. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci*. 89, 171-186.
- URNER, F.; LEPPENS-LUISIER, G.; SAKKAS, D. 2001. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod*. 64, 1350-1357.
- VADNAIS, M.; KIRKWOOD, R.; SPECHER, D.; CHOU, K. 2005. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim Reprod Sci*. 90, 347-354.
- VADNAIS, M.; ROBERTS, K. 2007. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. *J Androl*. 28, 416-422.
- VADNAIS, M.; ALTHOUSE, G. 2011. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*. 76, 1508-1516
- VALENTE, S.; PEREIRA, R.; BAPTISTA, M.; MARQUES, C.; VASQUES, M.; PEREIRA, M.; BARBAS, J. 2010. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Anim Reprod Sci*. 117, 74-77.
- VAN GESTEL, R.; BREWIS, I.; ASHTON, P.; HELMS, J.; BROUWERS, J.; GADELLA, B. 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod*. 11, 583-590.
- VISCONTI, P. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106, 667-668.
- VISCONTI, P.; KRAPP, D.; DE LA VEGA-ELTRÁN, J.; ACEVEDO, J.; DARSZON, A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*. 13, 395.
- WANG, Z.; WIDGREN, E.; RICHARDSON, R.; O'RAND M. 2007. Characterization of an eppin protein complex from human semen and spermatozoa. *Biol Reprod* 77, 476-484
- WATSON, P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 7,871-891.
- WATSON, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 60, 481-492.

- WATSON, P. 1986. Problems in the cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*. 23, 547.
- WATSON, P.; DUNCAN, A. 1988. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 25, 131-142.
- WHITE, I. 1953. The effect of washing on motility and metabolism of ram, bull and rabbit spermatozoa. *J Biol*. 30, 200-213.
- WHITE, I. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*. 5 639–658.
- WILKINSON, D.; HARRISON, R. 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 9, 443-448.
- WINDSOR, D. 1994. Artificial insemination of ewes with fresh semen. Department of Agriculture, Western Australia Bulletin, Series 4. 34(1):21-25
- WOLF, D. 1995. Lipid domains in sperm plasma membranes. *Mol MembrBiol*. 12, 101-104.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zigote*. 3,371-372.
- YANAGIMACHI, R. 2011. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization?. *Biol Reprod*. 85, 4-5.
- YEAGLE, P. 1991. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie*. 73, 1303-1310.
- YEUNG, W.; LEE, K.; KOISTINEN, H.; SEPPALA, M.; HO, P. 2006. Roles of glycodefin in modulating sperm function. *Mol Cell Endocrinol*. 250,149-56.
- YUE, W.; SHI, L.; BAI, Z.; REN, Y.; ZHAO, Y. 2009. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of ram seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. *Anim Reprod Sci*. 116, 386-391.
- ZALAZAR, L.; LEDESMA, A.; HOZBOR, F.; CESARI, A. 2016. Heterologous recombinant protein with decapacitating activity prevents and reverts cryodamage in ram sperm: An emerging biotechnological tool for cryobiology. *Anim Reprod Sci*. 164, 31-39.

## 7. ANEXO

**Tabla 8.** Proteínas del plasma seminal ovino expresadas diferencialmente en eyaculados colectados con vagina artificial y electroeyaculación

Proteína	Extraída	kDa/pl experimental	Número de acceso NCBI	MS/MS proteína score	Secuencia cubierta (%)	Péptidos coincidentes
Seminal vesicles 14 kDa protein precursor (RSVP 14) [Ovis aries]	1D-PAGE	17	219521810	51	15	DKSSEESHEDEECVFPFTYK SSEESHEDEECVFPFTYK
	2D-PAGE	15.0/4.6	219521810	258	15	DKSSEESHEDEECVFPFTYK SSEESHEDEECVFPFTYK
Binder of sperm 5 precursor [Ovis aries]	1D-PAGE	28	148225308	98	49	RIYYK ICSDGDRPK CHFPFIYR EYAWQYCDR WKICSDGDRPK EYAWQYCDRY EWCSLDEDYVGR CTSVNSEREWCSLDEDYVGR CTTEGSAFGLAWCSLLEYFER CTSVNSEREWCSLDEDYVGR TQIEQTNEEK DSENKLNK
Clusterin isoform 1 [Ovis aries]	1D-PAGE	38	426220555	112	25	IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR EQSHVMDVMEDSFTR ASSIMDELQDR ASSIMDELQDRFFPR RPQDTQYYSPFSSFPR GSLFFNPK TPYHFPVTEFTENNDR TPYHFPVTEFTENNDRTVCK TVCKEIR ALQQYR
Seminal vesicle protein precursor (RSVP22) [Ovis aries]	2D-PAGE	24.0/ 4.8	219521812	58	34	CHFPFIYR EYAWQYCDR EWCSLDEDYVGR CTTEGSAFGLAWCSLLEYFER
Epididymal secretory protein E1 precursor [Bos taurus]	2D-PAGE	12.0/7.0	27806881	80	15	SGIRCPIEK VVVEWELTDDKNQR

**Tabla 9.** Análisis general del modelo lineal de los patrones de movilidad de las subpoblaciones entre tratamientos (carneros con baja o alta fertilidad). La tabla muestra las estimaciones de los parámetros y los intervalos de confianza del 95% (CI: entre paréntesis) solo para el mejor modelo seleccionado (en negrita). Los valores entre paréntesis son los intervalos de confianza superior e inferior. AICc: criterio de información Akaike para muestras pequeñas;  $\Delta_i$ : diferencias AICc y  $w_i$ : datos normalizados de AICc. T: tratamiento

Parámetro	Modelos	AICc	$\Delta_i$	$w_i$	Variable explicativa	Parámetro estimado (CI)
CL1	T	1754.57	1.26	0.65	–	–
	<b>Nulo</b>	<b>1753.31</b>	<b>0.00</b>	<b>0.35</b>		
CL2	<b>T</b>	<b>606.48</b>	<b>0.00</b>	<b>1.00</b>	Alta Fertilidad	-5.08 (-5.73 to -4.42)
					Baja Fertilidad	3.81 (3.14 to 4.47)
	Nulo	1023.36	416.88	0.00		
CL3	<b>T</b>	<b>2410.98</b>	<b>0.00</b>	<b>1.00</b>	Alta Fertilidad	-0.87 (-0.98 to -0.75)
					Baja Fertilidad	-0.78 (-0.96 to -0.61)
	Nulo	2487.48	76.5	0.00		
CL4	<b>T</b>	<b>181.75</b>	<b>0.00</b>	<b>1.00</b>	Alta Fertilidad	-2.47 (-2.67 to -2.28)
					Baja Fertilidad	-1.37 (-1.76 to -0.97)
	Nulo	234.52	52.77	0.00		

**Tabla 10.** Análisis general del modelo de efectos mixtos lineales de los patrones de movilidad de las subpoblaciones entre tratamientos dentro de la estación reproductiva o contraestación. Se analizaron todos los modelos posibles para cada subpoblación (clúster 1, 2, 3 y 4) incluyendo el modelo completo, nulo y el mejor (en negrita). AICc: criterio de información Akaike para muestras pequeñas;  $\Delta_i$ : diferencias AICc y  $w_i$ : se muestran los datos normalizados de AICc. T: tratamiento. E: estación

Cluster		Selección de modelos	AICc	$\Delta_i$	$w_i$
1		T : E	3226.56	0.00	0.50
		T + E + T : E	3226.56	0.00	0.50
		T + E	3487.33	260.77	0.00
		T	3495.31	268.75	0.00
		E	46.21.03	1394.47	0.00
		Nulo	4657.82	1431.26	0.00
2*	Reproductiva	T	285.10	0.00	1
		Nulo	297.68	12.58	0
	Contraestación	T	626.59	0.00	1
		Nulo	733.55	106.96	0
3**	Reproductiva	T	1083.25	0.00	1
		Nulo	2671.26	1588.01	0
	Contraestación	T	1028.57	0.00	1
		Nulo	1812.58	784.02	0
4		T : E	685.37	0.00	0.50
		T + E + T : E	685.37	0.00	0.50
		T + E	814.37	129	0.00
		T	821.70	194.33	0.00
		E	879.70	194.33	0.00
		Nulo	888.88	203.51	0.00

\* La tabla muestra el análisis individual para la estación reproductiva y contraestación ya que el análisis de todos los modelos posibles reveló que la interacción entre el tratamiento y la estación no fue significativa.

\*\* La tabla muestra el análisis de datos para la estación reproductiva independientemente de la contraestación ya que las proporciones de subpoblaciones entre el control y los tratamientos muestran diferentes tendencias entre las estaciones.

**Tabla 11.** Efecto de los patrones de movilidad de la subpoblación entre los tratamientos dentro de estación reproductiva o en contraestación. La tabla muestra las estimaciones de los parámetros para los modelos generales de efectos mixtos lineales seleccionados. Los valores entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza superior e inferior (95%). PS VA: adición de plasma seminal obtenido con vagina artificial; PPSiE VA: proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides obtenidas mediante vagina artificial; PS EE: plasma seminal obtenido con electroeyaculación; PPSiE EE: proteínas del plasma seminal que interactúan con los espermatozoides obtenidas mediante electroeyaculación. Las diferencias entre tratamientos para cada subpoblación (grupo) se establecieron mediante la comparación de los intervalos de confianza

Cluster	Estación	Control	PS VA	PS EE	PPSiE VA	PPSiE EE
1	Reproductiva	-0.30 (-0.52; -0.08)	1.01 (0.81; 1.21)	-1.34 (-0.92; -0.54)	0.10 (-0.08; 0.28)	-2.24 (-2.46; -2.02)
	Contraestación	-0.73 (-0.92; -0.54)	1.07 (0.75; 1.38)	-0.66 (-0.84; -0.45)	-0.47 (-0.65; -0.29)	-1.25 (-1.45; -1.06)
2	Reproductiva	-2.82 (-4.18; -1.47)	-0.06 (-0.40; 0.28)	0.36 (-0.03; 0.77)	-0.39 (-0.74; -0.04)	0.17 (-0.20; 0.54)
	Contraestación	-1.13 (-1.64; -0.61)	-0.43 (-0.63; -0.22)	-1.58 (-1.90; -1.26)	-0.46 (-0.66; -0.26)	-0.58 (0.81; -0.35)
3	Reproductiva	-1.54 (-2.77; -0.29)	-26.11 (-315.79; 263.57)	1.72 (1.41; 2.03)	-1.28 (-1.57; -0.98)	1.52 (1.23; 1.81)
	Contraestación	-2.19 (-3.44; -0.93)	-26.33 (343.66; 291.01)	0.38 (0.09; 0.67)	-0.98 (-1.26; -0.69)	1.34 (1.05; 1.60)
4	Reproductiva	-1.17 (-1.66; -0.67)	-1.66 (-2.07; -1.24)	-1.52 (-2.07; -0.96)	0.02 (-0.27; 0.31)	0.31 (-0.03; 0.64)
	Contraestación	-1.80 (-2.39; -1.22)	-2.60 (-3.24; -1.94)	0.18 (-0.14; 0.50)	-0.25 (-0.54; 0.04)	-0.87 (-1.29; -0.44)