

## **PERFIL ELECTROFORÉTICO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA DE TOROS SANMARTINERO**

Restrepo-Rubio<sup>1</sup>, N., Herrera-León<sup>1</sup>, R.F., Rueda-Alfonso<sup>1</sup>, F.L., Velásquez-Penagos<sup>1</sup>, J.G., Cebrián-Pérez<sup>2</sup>, J.A., Muiño-Blanco<sup>2</sup>, T. y Cardozo-Cerquera<sup>1</sup>, J.A.

<sup>1</sup>Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Colombia.

<sup>2</sup>Universidad de Zaragoza. España.

jcardozoc@gmail.com

### **INTRODUCCIÓN**

El desarrollo de la proteómica ha evidenciado que la fertilidad del macho está fuertemente ligada a la presencia o ausencia de proteínas específicas (DeJarnette et al., 2009). Se conoce que las proteínas de la membrana espermática juegan un papel decisivo en la fecundación y están implicadas en diversas funciones, como la motilidad, la unión a células del epitelio oviductal en el tracto reproductor femenino, la capacitación, la reacción acrosómica, la unión a zona pelúcida, penetración y unión con la membrana plasmática del ovocito para su posterior fusión (Calvete, 1995). El estudio de las proteínas de la membrana espermática permite explicar aspectos de la fisiología de la célula desde la perspectiva molecular, además de evidenciar interacciones entre diversas proteínas y su influencia en la funcionalidad del espermatozoide en las diferentes etapas de su vida.

Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación evidenciaron la superior fertilidad de los toros Sanmartinero, criollos colombianos, descendientes de las razas españolas, frente a toros de razas foráneas como el Cebú Brahman. El objetivo de este trabajo fue establecer por medio de electroforesis bidimensional, el perfil de las proteínas de la membrana espermática de toros Sanmartinero, la concentración de las mismas, y determinar su correlación con parámetros de calidad seminal, tales como motilidad individual, concentración y viabilidad espermáticas.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

El experimento se realizó con semen de 10 toros de la raza Sanmartinero, pertenecientes al Banco de germoplasma animal y ubicados en el centro de Investigación (CI) La Libertad de CORPOICA (departamento del Meta, Colombia). La determinación de los parámetros de calidad seminal y la extracción de las proteínas de membrana, se realizó en el laboratorio de Reproducción Integral Animal (CRIA) del mismo centro. La cuantificación de las proteínas de las muestras y la separación por electroforesis bidimensional de las proteínas, se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Molecular (LMM) del Centro de Biotecnología y Bioindustria (departamento de Cundinamarca, Colombia). Las proteínas de membrana se obtuvieron por el Método N-Octyl L-Glucopiranoside (Pixton et al., 2004). La concentración de proteínas de membrana se determinó por el método de Bradford (1976). La 2D-PAGE se realizó de acuerdo al método descrito por O'Farrel et al. (1975). La tinción del gel se realizó con Sypro Ruby (Bio Rad, Rockville Centre, NY, EE.UU.) y las imágenes de los geles se analizaron con el software PDQuest de (Bio Rad, Rockville Centre, NY, EE.UU.). Todos los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SAS ®. La correlación entre los puntos de proteína y las variables de calidad seminal se realizó por la prueba de Pearson.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La calidad espermática evidenció valores de  $82,4 \pm 105$  para viabilidad espermática,  $85,5 \pm 11,7$  para motilidad individual y concentración espermática de  $1,528 \pm 424 \times 10^6$  espermatozoides/mL, similares a los reportados por Rueda 2010.

Se detectaron un total de 485 puntos de proteína, con pesos moleculares entre 10,5 y 163,6 kDa, y puntos isoeléctricos (Pis) entre 3,3 y 9,5. En el 2006, Roncoletta identificó 391 puntos de proteína en la membrana espermática de toros Nelore. En espermatozoides de moruecos de la raza Rasa Aragonesa, Cardozo (2011) detectó 150 puntos de proteína. Es importante destacar que este es el primer estudio del proteoma de la membrana espermática de toros Criollo Sanmartinero. El análisis evidenció que diez puntos de proteína se correlacionaron con las variables de calidad seminal mencionadas (Tabla 1). El punto de proteína de 14,25

kDa y pl de 5,43, podría corresponder a la SM246 descrita por Roncoletta (2006), la cual aparece en altas concentraciones en toros de baja fertilidad. Este hecho podría explicar en parte la correlación inversa encontrada con la viabilidad espermática en este trabajo. Es posible que esta proteína pertenezca al grupo de las BSP (*Bovine seminal plasma*) con un peso molecular de 14,3 kDa; pl 5 (SM246). Las BSP, son proteínas del plasma seminal, que se adsorben a la membrana espermática en el momento de la eyaculación, y desempeñan inicialmente un papel importante en la estabilización de la membrana (proceso conocido como decapitación espermática), impidiendo que ocurra la reacción acrosómica.

El punto de 40,05 kDa y pl 5,86 presentó correlación negativa con la viabilidad espermática; este podría corresponder a la proteína reguladora de la unión entre la cadena alfa de la proteína G y el GTP (Guanosin trifosfato) descrita por Pate (2008). De acuerdo a la función de regulación de esta proteína, es posible que para este caso, la proteína esté permitiendo la unión de la cadena alfa de la proteína G con la GTP, ocasionando la inestabilidad de la membrana o alteraciones en su morfología, lo que explicaría de esta forma la correlación negativa con la viabilidad espermática encontrada para ella en este estudio.

El punto de 50,97 kDa y pl 6,46, presentó correlaciones negativas con la viabilidad y la motilidad espermática, y podría corresponder a la tektina-2, descrita por Mariappa (2010), la cual es una proteína de membrana localizada a nivel flagelar, que contribuye a la estabilización de la compleja estructura de los micro túbulos del axonema. Mariappa (2010) demostró que la inhibición de la fosforilación en los residuos de tirosina de esta proteína resulta en el deterioro de la flexión del flagelo, por lo que su deficiencia puede desembocar en la infertilidad del macho, por la incapacidad del espermatozoide para moverse.

El punto de 42,03 kDa y pl 6,39, presentó correlación positiva con la concentración espermática. A este respecto, en la literatura internacional no se encontraron estudios de proteína alguna que incida sobre la concentración espermática y que corresponda con el peso molecular y punto isoelectrico mencionados, lo que hace suponer que se esté frente a una proteína aún no identificada. De otra parte, el punto de 163,6 kDa y pl 6,1, presentó correlación positiva con la concentración espermática; sin embargo tampoco se ha reportado proteína alguna con este peso molecular, relacionada con este parámetro.

Los resultados encontrados permiten entender la importancia del estudio del proteoma de la membrana espermática, para comprender la razón de la superior fertilidad encontrada en los toros de las razas bovinas criollas colombianas, cuando se comparan con reproductores de razas foráneas (Rueda, 2010). En esta investigación se evidenciaron relaciones entre diversas proteínas y funciones importantes del espermatozoide en la raza Sanmartinero.

Es necesario sin embargo, llevar a cabo la secuenciación de las proteínas que presentaron correlación con los parámetros de calidad seminal evaluados, con el fin de identificarlas y tener una aproximación más clara acerca de su funcionalidad en el espermatozoide.

Los resultados aquí presentados justifican la realización de futuras investigaciones que lleven a establecer marcadores moleculares de fertilidad, con miras a elevar los índices de eficiencia reproductiva de los hatos bovinos del país.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Calvete, J.J., Sanz, L., Enßlin, M., Töpfer, E., 1995. Sperm Surface Proteins. Reproduction in Domestic Animals 31, 101-105.
- Cardozo, J.A. 2011. Proteínas seminales ovinas protegen el esperma de los daños del frío, Ed. Agrícola Española, Zaragoza, España.
- DeJarnette, J.M., Nebel, R.L. Marshall, C.E., 2009, Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71(1), 49-58.
- Mariappa, D., Aladakatti, R.H., Dasari, S.K., Sreekumar, A., Wolkowicz, M., van der Hoorn, F., Seshagiri, P.B., 2010. Inhibition of tyrosine phosphorylation of sperm flagellar proteins, outer dense fiber protein-2 and tektin-2, is associated with impaired motility during capacitation of hamster spermatozoa. *Mol. Rep. Dev.* 77, 182-193.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250, 4007 - 4021.
- Pate, B.J., White, K.L., Chen, D., Aston, K.I., Sessions, B.R., Bunch, T.D., Weimer, B.C., 2008. A novel approach to identify bovine sperm membrane proteins that interact with

receptors on the vitelline membrane of bovine oocytes. Mol. Rep. Dev. 75(4), 641-649. • Roncoletta, 2006. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. Animal Reproduction Science 91, 77-87. • Rueda, F., 2010. Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la integridad de la membrana del espermatozoide sometido a procesos de criopreservación. Maestría. Universidad Nacional de Colombia Bogotá.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura, Fedegan, IICA (código de proyecto: 2010-1284) y CORPOICA.

**Tabla 1.** *Peso molecular (Mr) en kiloDaltons (kDa), punto isoelectrico (pI), y correlación de los puntos de proteína de la membrana espermática de toros de raza Sanmartinero con los parámetros de calidad seminal.*

| Punto          | SANMARTINERO  |               |              |
|----------------|---------------|---------------|--------------|
| (Mr (kDa); pI) | Motilidad     | Concentración | Viabilidad   |
| (14,25; 5,43)  |               |               | -0,74 p<0,01 |
| (22,28; 5,68)  |               | 0,78 p<0,002  |              |
| (40,05; 5,86)  |               |               | -0,44 p<0,04 |
| (42,03; 6,39)  |               | 0,55 p<0,01   |              |
| (50,21; 5,66)  |               | 0,67 p<0,01   |              |
| (50,97; 6,46)  | -0,60 p< 0,05 |               | -0,62 p<0,04 |
| (55,97; 5,48)  |               |               | -0,69 p<0,02 |
| (57,55; 6,70)  | -0,75 p<0,01  | -0,76 p<0,01  |              |
| (58,94; 5,57)  |               |               | -0,61 p<0,01 |
| (163,66; 6,13) |               | 0,51 p<0,02   |              |

## TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORETIC PROTEIN PROFILE OF THE SPERM MEMBRANE FROM SANMARTINERO BULLS

**ABSTRACT:** This study was conducted to analyze the bovine sperm membrane proteins composition using two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis (2D-PAGE) with a polyacrilamide linear gradient gel and the correlation between specific protein and semen characteristics. Semen samples from 10 Sanmartinero bulls, 3 to 4 yrs of age, were assessed for semen quality in terms of spermatozoa motility viability and sperm concentration. Spermatozoa extracts were separated using 2D-PAGE followed by staining with sypro ruby. Three ejaculates per bull were analyzed. Semen was analyzed for percentages of motility and viability and for sperm concentration. In the present work 2D-PAGE of proteins extracted from Sanmartinero bull spermatozoa led to the resolution of 485 protein spots, with pls ranging from 3.3 to 9.5, and molecular weight from 10.5 to 163.6 kDa. Ten protein spots were negatively or positively correlated with some semen quality parameters (motility, viability, concentration). Thus, this study indicates that bovine sperm membrane contains specific proteins that are associated with semen characteristics. It may be that these protein patterns can be used as markers for improving bovine reproduction. The present data provide new and important information on reproduction Colombian creole cattle bull and opens up the possibility to perform additional experiments.

**Key words:** Electrophoresis, sperm membrane proteins, proteomic, seminal viability.